

JULIANA LEONE STAUT

**CORRELAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DO TESTÍCULO DE CARNEIROS
SUFFOLK NAS FASES DO CICLO REPRODUTIVO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia – Área de concentração em Patologia,
Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles

Co-orientadora: Dra. Samira Chahad-Ehlers

CURITIBA
2009

JULIANA LEONE STAUT

**CORRELAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DO TESTÍCULO DE CARNEIROS
SUFFOLK NAS FASES DO CICLO REPRODUTIVO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia – Área de concentração em Patologia,
Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles

Co-orientadora: Dra. Samira Chahad-Ehlers

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles pela oportunidade, pela orientação, e por ter proporcionado toda infra-estrutura e subsídios para que este trabalho atingisse o resultado obtido;

À Dra. Samira Chahad-Ehlers, um exemplo de profissional a ser seguido, que foi de fundamental importância neste trabalho passando seus conhecimentos e experiências! Obrigada por todos seus ensinamentos, pela orientação, e por toda atenção, simpatia e dedicação;

À Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol por ter cedido o material deste estudo, possibilitando a realização deste trabalho;

À Dra. Viviane Milczewski que deu início a este estudo, e me possibilitou fazer parte desta linha de pesquisa;

À Profa. Dra. Silvana Maris Círio; por fazer parte e estar sempre presente em minha formação;

À Neila Aparecida de Souza, do Hospital de Clínicas de São Paulo, que nos cedeu um importante anticorpo para o estudo;

Às técnicas do laboratório de imunohistoquímica do Setor de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Curitiba, que colaboraram com as reações imunohistoquímicas;

À Eliane Maria de Siqueira, que sempre foi muito prestativa e atenciosa toda vez que precisei de algo;

À minha amiga Fernanda Martins Pinto, pelos conhecimentos e pela ajuda em alguns momentos,

A toda equipe do Setor de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Curitiba, que sempre foram muito atenciosos;

Ao meu marido Carlos Eduardo Staut, meu maior incentivador, conselheiro, sempre muito amável e atencioso, que eu amo muito e tenho maior orgulho em ser esposa,

À minha mãe Maria Alice Leone que eu amo muito, e sempre me proporcionou suporte e condições para que eu chegasse até aqui;

À toda minha família que sempre me apoiou; minha avó, minha tia, meu tio, minhas primas;

À meus amigos que sempre estiveram do meu lado,

À todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho!

Dedico este trabalho ao meu filho Pietro que nasceu durante este estudo e é a maior razão da minha vida!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Testículo de carneiro Suffolk. (A) Aspecto macroscópico do testículo e (B) amostras de aproximadamente 1 x 1 x 0,5 cm destinadas aos estudos morfológicos e morfométricos.....	34
FIGURA 2: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação para contagem do número de túbulos seminíferos. 40X.....	37
FIGURA 3: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação para medir o diâmetro do túbulo seminífero. 100X.....	37
FIGURA 4: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação para medir a espessura do epitélio germinativo. 100X.....	38
FIGURA 5: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação para numerar camadas celulares do epitélio germinativo. 400X.....	38
FIGURA 6: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação para contar diferentes tipos de células do epitélio germinativo. 400X.....	39
FIGURA 7: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação de células com imunocoloração positiva para o anticorpo monoclonal Ki-67. 400X.....	40
FIGURA 8: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação de células com imunocoloração positiva para o anticorpo monoclonal vimentina. 400X ...	40
FIGURA 9: Testículo de carneiro Suffolk. Aspectos histológicos dos túbulos seminíferos testiculares nas fases de menor (A) e maior (B) circunferência escrotal. 100X.....	42
FIGURA 10: Média de células do epitélio germinativo (trofismo) por túbulo seminífero de carneiros Suffolk nas fases de menor e maior circunferência escrotal.....	45
FIGURA 11: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação de células de Sertoli pelo anticorpo vimentina nas fases de maior (A) e menor (B) circunferência escrotal. 400X.....	48
FIGURA 12: Testículo de carneiro Suffolk. Marcação da proliferação celular das espermatídes da linhagem germinativa pelo anticorpo monoclonal Ki-67 nas fases de menor (A) e maior (B) circunferência escrotal. 400X.....	49
FIGURA 13: Média de células de Sertoli marcadas pelo anticorpo VIM (vimentina) e da proliferação celular das espermatídes marcadas pelo anticorpo Ki-67 nas fases de menor e maior circunferência escrotal	49

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Valores médios referentes à quantidade de células do epitélio germinativo em carneiros Suffolk nas fases de menor e maior circunferência escrotal acompanhado do cálculo de p 45
- TABELA 2: Valores médios da circunferência escrotal (SC); do diâmetro tubular, espessura da camada celular e número de camadas celulares de túbulos seminíferos de carneiros Suffolk nas fases de menor e maior circunferência escrotal, acompanhado do cálculo de p 46
- TABELA 3: Valores médios referentes à quantidade de células de Sertoli e células germinativas proliferantes nas fases de menor e maior circunferência escrotal, acompanhado do cálculo de p 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 JUSTIFICATIVA	14
4 REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1 RITMOS BIOLÓGICOS	15
4.1.1 A sazonalidade reprodutiva dos ovinos	18
4.2 TEMPORIZAÇÃO SAZONAL	20
4.3 VIAS DO CONTROLE SAZONAL EM TESTÍCULOS DE CARNEIROS	22
4.4 MODIFICAÇÕES SAZONAIS NA ESPERMATOGÊNESE E HISTOLOGIA TESTICULAR	23
4.4.1 Fisiologia Testicular	23
4.4.2 Espermatogênese e Espermiação	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 INSERÇÃO DO PROJETO NA LINHA DE PESQUISA	32
5.2 PROCEDIMENTO DE CAMPO PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	32
5.3 MATERIAL	33
5.4 TÉCNICA HISTOLÓGICA	34
5.5 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA	35
5.6 ESTUDOS MORFOMÉTRICOS	36
5.6.1 Número de túbulos seminíferos	37
5.6.2 Diâmetros dos túbulos seminíferos	37
5.6.3 Espessura do epitélio germinativo	38
5.6.4 Número de camadas do epitélio germinativo	38
5.6.5 Número de cada tipo celular: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides, células de Sertoli	39
5.6.6 Número de células do epitélio germinativo com imunocoloração positiva para o Anticorpo Monoclonal Ki-67, por túbulo seminífero	40
5.6.7 Número de células do túbulo seminífero com imunocoloração positiva para o Anticorpo Monoclonal vimentina, por túbulo seminífero	40
5.7 ESTUDOS ESTATÍSTICOS	41
6 RESULTADOS	42
6.1 ASPECTOS HISTOLÓGICOS	42

6.2 DESCRIÇÃO DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO E CÉLULAS DE SERTOLI.....	42
6.3 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DA QUANTIDADE DE CÉLULAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO.....	44
6.4 VALORES MORFOMÉTRICOS DO DIÂMETRO DO TÚBULO SEMINÍFERO, DA ESPESSURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO E DO NÚMERO DE CAMADAS	46
6.5 ASPECTO IMUNOHISTOQUÍMICO.....	47
7 DISCUSSÃO.....	50
8 CONCLUSÕES.....	58
9 REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICES.....	66

RESUMO

O alto grau de interesse em ovinos domésticos gera um aumento nas atividades de criação, principalmente pelo atrativo econômico gerado pela espécie. No entanto são animais que apresentam estacionalidade reprodutiva com concentração deaios e modificações no aparelho reprodutivo e comportamentais. O ovino da raça Suffolk é considerado espécie-modelo para estudos de sazonalidade reprodutiva porque o fotoperíodo influencia a dinâmica hormonal do eixo hipotálamo–hipófise–testículo; o que acarreta a estacionalidade reprodutiva da espécie. Este estudo avaliou as modificações morfológicas nas gônadas de ovinos Suffolk influenciadas pelo fotoperíodo através de análises morfométricas e imunohistoquímicas de cortes histológicos do testículo. Foram medidos o diâmetro do túbulo, a espessura do epitélio germinativo e o número de camadas celulares, além do número de células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermátides nas fases de menor e maior circunferência escrotal. A fase de maior circunferência escrotal apresentou um número maior de células do epitélio germinativo que a fase de menor circunferência escrotal. Porém não houve diferença no número de células de Sertoli entre as duas fases. Conclui-se que em ovinos Suffolk ocorrem modificações no tamanho e peso das gônadas masculinas bem como no epitélio germinativo, correlacionadas diretamente com as fases reprodutivas sazonais.

Palavras-chave: Ovinos Suffolk, Fotoperíodo, Reprodução, Sazonalidade.

ABSTRACT

The high degree of interest in the domestic ovine has caused an increase in the breeding activity, mainly for the economical appeal generated for the species. However they are animals that present reproductive breeding season with concentration of ruttings and modifications in the reproductive device and behavior. The Suffolk breed is considered species-model for studies of seasonal reproduction because photoperiod influences the hormonal dynamics of the hypothalamus-hypophysis-testicle axis; which is responsible by the stationary reproduction of the species. This study evaluated the modifications in gonadal morphology of Suffolk rams influenced by photoperiod through morphometric analysis and imunohistochemistry of histological cuts of the testicle. In the phases of minor and major scrotal circumference the seminiferous tubules, were measured by taking its diameter, the thickness of the germinative epithelium and the number of cellular layers, beyond the frame number of Sertoli, spermatogonia, spermatocytes and spermatids. The phase of larger scrotal circumference presented higher number of cells of the germinative epithelium than the phase of smaller scrotal circumference. Differences in number of Sertoli between the two phases were not detected. It was concluded that modifications occur on size and weight of Suffolk rams gonads as well as in the germinative epithelium, and these parameters are directly correlated with seasonal reproductive phases.

Key-words: Ram reproduction; Suffolk; Seasonality; Morphometry.

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos domésticos (*Ovis aries*) são geralmente conhecidos por serem animais produtores de lã, porém, características relativas à conversão alimentar também fazem desta espécie umas das mais criadas no mundo. Além da lã e da carne, outros produtos são igualmente importantes como o couro e as víceras. Tais condições fazem desta espécie uma importante vertente no contexto econômico mundial (BICUDO, 2005).

A reprodução dos ovinos possui diversas particularidades, entre elas o fato de apresentarem estacionalidade reprodutiva com a concentração das ocorrências de cio no final do verão e durante o outono. Nesta fase o animal sofre modificações em seu comportamento e em seu aparelho reprodutivo (HELLGRENT, 1989; MIGLINO, 2004; BICUDO, 2005).

Esta restrição reprodutiva vem como resposta a manifestação de um ritmo biológico do animal, que é expresso através de processos fisiológicos e comportamentais (MARQUES, 1997). A importância da presença de um relógio biológico está na necessidade do organismo se preparar antecipadamente para uma determinada atividade (PITTENDRIGH, 1960).

A restrição reprodutiva é uma das estratégias de sobrevivência que garante a continuidade de uma espécie. Ela é comum para a maioria dos animais silvestres e assegura que os nascimentos ocorram num momento favorável para a sobrevivência dos recém-nascidos (LINCOLN e SHORT, 1980). A temporada de nascimento usualmente ocorre nos meses de inverno ou início da primavera (BICUDO, 2005); no entanto, tal fato pode ser considerado como um fator gerador de entressafra de produtos ovinos o que acarreta grandes dificuldades do fortalecimento da cadeia produtiva. O consumo de carne ovina vem crescendo de forma importante no Brasil

nos últimos anos, porém parte do mercado interno precisa ser suprido através de importações devido, entre outros fatores, à sazonalidade de produção de cordeiros (BICUDO, 2005; SANTOS, 2005).

Sabe-se que a restrição reprodutiva anual tem o fotoperíodo como o principal sincronizador, ou seja, a duração do tempo em horas de claro (fotofase) e de escuro (escotofase) que se modifica diariamente (MARQUES e MENNABARRETO, 1997) e determina o grau de atividade reprodutiva de certas raças. A principal diferença entre as diversas raças ovinas e as latitudes onde elas são criadas diz respeito a duração e a magnitude de mudanças relacionadas à reprodução tais como: tamanho testicular, secreção de gonadotrofinas, atividade testicular, produção espermática e comportamento sexual (LINCOLN *et al.*, 1990; DICKSON e SANFORD, 2005). Não há dúvida de que ter uma estação reprodutiva definida pode ser uma importante estratégia para a sobrevivência de algumas espécies animais (ROSA e BRYANT, 2002).

Nas raças estacionais as mudanças de dias longos para dias curtos ocorrem no final do verão e início do outono e parece ser esse o sinal que modifica, por exemplo, o crescimento testicular e a produção de sêmen, que se torna mais elevada e de melhor qualidade, caracterizando a estação reprodutiva do animal. Fora da estação reprodutiva, podem ocorrer alterações como diminuições no tamanho do testículo, no diâmetro dos túbulos seminíferos, na atividade das células de Leydig, nos hormônios e na produção de espermatozóides (ORTAVANT, 1959; LINCOLN e SHORT, 1980; MICKELSEN *et al.* 1981; MORTIMER e LINCOLN, 1982; HOCHEREAU-DE REVIERS *et al.* 1985).

Ovinos da raça Suffolk são provenientes de climas frios, mais especificamente da Inglaterra, e apresentam uma estação reprodutiva bem definida

durante o ano, fato esse atribuído à influência de um fotoperíodo regular (PINEDA 1989, CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991; MARTIN *et al.* 2002). Os machos respondem a tais estímulos fotoperiódicos com alternância entre aumento e diminuição do sucesso reprodutivo (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991).

Nas raças consideradas sazonais, as variações na estrutura do epitélio dos túbulos seminíferos são relatadas e apontam distintos níveis de trofismo epitelial. De fato, há estudos morfológicos que demonstram um percentual de variação no diâmetro dos túbulos em várias raças de ovinos, sobretudo aquelas originárias de altas latitudes (SCHAMBACHER e FORD, 1979). Em termos qualitativos estruturais, alguns autores mencionam a presença de certo grau de degeneração ocorrendo em células de Sertoli durante a fase de menor circunferência escrotal (WALLGREN *et al.*, 1993, GASTEL *et al.*, 1995), embora o seu número tem sido relatado como sendo o mesmo durante o ano todo (HOCHEREAU-DE REVIERS *et al.*, 1985; BIELLI *et al.*, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar os aspectos histológicos e imunohistoquímicos dos testículos de carneiros Suffolk, avaliados morfometricamente, com as variações nos períodos reprodutivos sazonais destes animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Caracterizar histologicamente a influência do fotoperíodo no epitélio seminífero de carneiros Suffolk nas fases de maior e de menor circunferência escrotal.

2 - Descrever os efeitos da sazonalidade através de análises morfométricas do epitélio seminífero, realizadas em Hematoxilina-Eosina (H-E).

3 - Descrever os efeitos da influência do fotoperíodo no epitélio seminífero de carneiros Suffolk através de análises morfométricas, realizadas em imunomarcações.

3 JUSTIFICATIVA

O ovino é considerado espécie-modelo para estudos de sazonalidade reprodutiva e, em particular, a raça Suffolk que tem o fotoperíodo como um dos principais responsáveis pela estacionalidade reprodutiva da espécie. O alto grau de interesse nestes animais acarreta um aumento nas atividades de criação, principalmente pelo atrativo econômico gerado pela espécie, devido ao grande consumo dos produtos oriundos da ovinocultura. Todavia, a produção de carcaças padronizadas se restringe a poucos meses do ano e gera o aparecimento de entressafra e oscilações de mercado, impossibilitando o fortalecimento da cadeia produtiva da ovinocultura. Isto faz com que haja a necessidade de mais estudos na área reprodutiva desta espécie para melhorar a produtividade e fertilidade o que aumentaria a viabilidade comercial da espécie.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 RITMOS BIOLÓGICOS

Quando se propõe um estudo baseado em ciclos diários ou sazonais, é necessário entender que existe nos seres vivos uma organização temporal que se manifesta na forma de ritmos biológicos em processos fisiológicos e comportamentais. Os ritmos biológicos incluem fenômenos como os ciclos de divisão celular, frequência cardíaca, ciclo sono/vigília, ciclo de atividade e repouso, ciclos reprodutivos, entre outros. A ciência que estuda esses ritmos é denominada Cronobiologia. Segundo MARQUES *et al.* (1997), pode-se definir ritmo como sendo um processo que varia periodicamente no tempo, ou é a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período. O período pode ser definido como o intervalo de tempo em que um ciclo se completa.

A maioria dos seres vivos possui um relógio endógeno capaz de gerar oscilações e transmiti-las ao organismo como um todo através de diversas vias eferentes ou efetores (HASTINGS *et al.*, 1991). Este relógio biológico (ou oscilador) interage com os ciclos externos resultando em um processo chamado de sincronização (ou arrastamento). Quem promove a sincronização de um ritmo biológico é o ciclo ambiental, denominado por ASCHOFF (1960) de “zeitgeber” (neologismo alemão que significa “doador de tempo”).

Os ritmos biológicos mais evidentes são aqueles que possuem periodicidades iguais aos ciclos ambientais. O principal deles são os ritmos relacionados aos movimentos de rotação, onde a Terra gira em torno de seu eixo gerando um ciclo de fases clara e escura que se soma em 24 horas (um dia) e corresponde a dois nasceres do sol consecutivos (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988). O

ambiente previsível e constante da Terra certamente impôs uma forte pressão seletiva nos organismos ali viventes. Por isso, não é surpresa que a grande maioria desses organismos tenha desenvolvido atividades comportamentais e metabólicas com periodicidades de 24 horas (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988; MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997).

Devido a isso é possível identificar, em diversos grupos de organismos, processos rítmicos com duração aproximadamente desse período, denominados por Franz Halberg em 1959 de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997). Há ainda os ritmos não-circadianos que são aqueles classificados em infradianos, ritmos de baixa frequência e conseqüentemente períodos maiores de 28 horas, e os ultradianos, com ritmos de frequência alta e com períodos menores de 20 horas. Todavia, é necessário ressaltar que um ritmo circadiano só pode ser assim chamado se ele foi experimentalmente testado, ou seja, se foi caracterizado por meio da expressão de seu ritmo endógeno já que, há muito se sabe que a expressão do relógio biológico tem como principal característica a sua auto-sustentabilidade (MOORE-EDE *et al.*, 1982). Estas observações são possíveis pelo isolamento de um organismo de pistas ambientais. Isso implica, de uma forma geral, em manter organismos noturnos no escuro constante e diurnos em claro constante. Assim, o organismo pode entrar em “livre-curso”, situação na qual ele passa a expressar seu ritmo endógeno, aquele gerado pelo seu relógio biológico. Este ritmo possui uma periodicidade não mais de 24 horas exatas como aquela observada sob influência dos ciclos ambientais, mas de uma periodicidade aproximada a 24 horas. Esses ritmos são a expressão de “relógios biológicos” e são denominados de “circa-ritmos”, como os circadianos,

circa-lunares, circa-marés e circanuais, assim denominados conforme a sua ritmicidade.

A importância da presença do relógio biológico em um organismo está comprovada há várias décadas. Segundo PITTENDRIGH (1960), o sentido de se ter um relógio endógeno auto-sustentado ao invés de apenas um simples mecanismo de resposta direta ao ciclo ambiental, está na necessidade do organismo se preparar antecipadamente para uma determinada atividade. Por outro lado, ele pode reagir diretamente a um estímulo ambiental sem que o relógio biológico seja envolvido e assim responder imediatamente às mudanças ambientais. Este processo chama-se “mascaramento”. Bem diferente dos “zeitgebers”, que afetam o oscilador provocando a sincronização do relógio biológico, os agentes mascaradores (ou moduladores) provocam reação direta dos sistemas efetores. Fatores que podem levar à respostas rápidas são, por exemplo, a temperatura, os regimes de chuva e outras variáveis ambientais (ASCHOFF, 1960). Não há dúvida de que o ciclo geofísico do dia e da noite proporciona um canal de comunicação entre um organismo e seu ambiente. E é através desse canal que não somente as informações diárias são comunicadas aos seres vivos, mas também as informações sazonais e latitudinais. O número de horas de claro (fotofase) e de escuro (escotofase) do ciclo diário (fotoperíodo) fornece sinais temporais para a sincronização das funções internas com informações necessárias para o organismo lidar com as exigências do ambiente externo. E é devido a essa capacidade dos seres vivos em detectar mudanças sazonais em face ao estímulo fotoperiódico que permite a eles habitarem uma variedade enorme de ambientes. Deste modo, a adaptação temporal é de fundamental importância para a sobrevivência de uma espécie, e lhe permite expressar determinadas funções e comportamentos nos momentos em que a

situação ambiental seja mais adequada para a sua expressão (BECK, 1980; MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997).

4.1.1 A sazonalidade reprodutiva dos ovinos

A mudança de fotoperíodo ao longo do ano é considerada a principal variável ambiental em climas temperados, enquanto que os ciclos anuais de chuvas e conseqüentemente disponibilidade alimentar são os fatores preponderantes em regiões tropicais. Isso significa que estas variáveis podem agir como “zeitgebers” em algumas latitudes e como agente mascarador em outras (MARQUES *et al.*, 1997). Quando estas variáveis atingem níveis agudos, alguns animais podem desenvolver respostas através de uma série de estratégias como: mudança de hábito alimentar, armazenamento de reservas energéticas, diminuição do metabolismo basal, substituição de pêlos ou plumas, hibernação ou migração (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2005). Um outro mecanismo é a restrição da atividade reprodutiva à melhor época do ano para assegurar os nascimentos no momento em que as condições ambientais sejam permissivas à sobrevivência (LINCOLN e SHORT, 1980). Esse mecanismo é bastante estudado nas regiões de altas latitudes. Todavia, independente da latitude, não há dúvidas de que as espécies com resposta sazonal na reprodução estejam sincronizadas por pistas ambientais mais seguras. Assim, verifica-se que animais adaptados a longo tempo aos trópicos freqüentemente respondem mais a outros fatores do ambiente como temperatura ou pluviosidade (LINCOLN e SHORT, 1980; MARQUES *et al.*, 1997; SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2005).

Como mencionado anteriormente, para definir um ritmo circadiano é necessário conhecer a expressão do caráter endógeno desse ritmo, e, portanto, o

mesmo deve ser considerado para os ritmos sazonais. Este conceito é aplicável tanto para os organismos que apresentam várias gerações no ano, quanto àqueles que possuem apenas uma geração. A explicação para isso é que um determinado comprimento de fotoperíodo denominado de “fotoperíodo sensível” induz o organismo a preparar-se antecipadamente para uma estratégia de sobrevivência (diapausa, migração, mudança de forma, cessação da atividade reprodutiva, etc.) que pode acontecer com o próprio indivíduo (geração atual) ou para a sua prole (geração futura) (BECK, 1980; MARQUES *et al.*, 1997).

Como também acontece em outros organismos, a fase reprodutiva dos ovinos ocorre num tempo diferente do ano sidereal, mostrando-se aproximadamente de 10 meses (WOODFILL *et al.*, 1994; LINCOLN, 2006). Em condições sincronizadas com fatores ambientais sabe-se que o ciclo reprodutivo em ovinos se modifica quando o regime fotoperiódico muda; e em condições naturais o aumento da fotofase provoca a parada da atividade estral e a sua diminuição estimula o desencadeamento de estros nas ovelhas (WOODFILL *et al.*, 1994; HULET e SHELTON, 1988). Em contraposição, em carneiros a atividade espermática não cessa totalmente, porém, o número de espermatozóides produzidos diminui conforme a estação (SCHANBACHER e FORD, 1979).

No entanto, é importante ressaltar que a época e a intensidade em que estas alterações ocorrem diferem conforme a raça e a latitude estudada. Um outro fato importante é que a atividade reprodutiva também depende do fotoperíodo do qual o animal originou-se. Dessa forma, uma mudança de regime fotoperiódico pode levar a alterações na fase inicial ou até mesmo na duração da atividade reprodutiva. Quando ovinos de uma raça e origem comuns são deslocados para próximo da

região equatorial, podem passar por uma estação de cobertura muito maior do que aqueles localizados nas regiões polares (HULET e SHELTON, 1988).

Machos ovinos exibem flutuações sazonais que podem ser verificados por padrões rítmicos no comportamento sexual, atividade hormonal, gametogênese e no volume e peso testicular (DICKSON e SANFORD, 2005; GÜNDOGAN, 2007). De acordo com KARAGIANNIDIS *et al.* (2000), a qualidade seminal se modifica conforme a estação do ano. A atividade sexual do macho é estimulada aproximadamente 30 a 45 dias antes em relação às ovelhas, e a vantagem para este estímulo antecipado é que ele determina um alto nível de atividade sexual nos machos no momento em que as fêmeas estão apenas iniciando seus ciclos ovulatórios (DICKSON e SANFORD, 2005; GÜNDOGAN, 2007).

4.2 TEMPORIZAÇÃO SAZONAL

Uma característica importante para garantir a sobrevivência de um organismo é a capacidade de antecipar eventos fisiológicos em relação aos eventos ambientais. Os mecanismos que possibilitam essa antecipação de eventos em relação ao ambiente é, a existência de um ritmo circanual intrínseco e o fotoperiodismo. Eles são os principais reguladores da sazonalidade em ovinos (WOODFILL *et al.*, 1994; LINCOLN *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, a restrição reprodutiva é regulada, primariamente pelo comprimento do dia. Todavia, como um organismo traduz esse estímulo luminoso?

Atualmente, sabe-se que os estímulos luminosos são recebidos por fotorreceptores localizados na retina e que são transmitidos para os núcleos supraquiasmáticos (NSQs), o relógio biológico dos mamíferos, através de um trato

monossináptico chamado trato retinohipotalâmico (ROSA e BRYANT, 2003). Os núcleos supraquiasmáticos são formados por dois pares de agrupamentos de neurônios localizados no hipotálamo, acima do quiasma ótico adjacente ao terceiro ventrículo (JOHNSON e EVERITT, 2000) e geram ritmos circadianos e sazonais. Portanto, estão envolvidos tanto na geração de ritmos circadianos que definem o dia e a noite como na medida de intervalos de tempo, mais especificamente do comprimento da noite, característicos de cada estação do ano.

O relógio do núcleo supraquiasmático sincroniza ciclos sazonais através do controle que exerce sobre a secreção noturna de melatonina, um neuro-hormônio da glândula pineal (ARENDT, 1998). Como a melatonina somente pode ser sintetizada durante a fase escura diária, a duração de seu pico reflete diretamente o comprimento da noite, cuja duração é longa no inverno e curta no verão, constituindo-se assim, em um verdadeiro calendário endócrino para regulação fotoperiódica de tecidos-alvo (GERLACH e AURICH, 2000; LINCOLN, 2006).

De uma forma geral, já se sabe que a melatonina circulante transmite informações fotoperiódicas a tecidos como a *pars tuberalis* da glândula pituitária e a região mediobasal do hipotálamo, por meio de receptores específicos (proteína G) presentes nesses tecidos (LINCOLN *et al.*, 2003). Eles são, respectivamente, mediadores da secreção sazonal de prolactina e gonadotropinas as quais regulam alterações reprodutivas e lactotrófico/metabólicas. Os sinais de saída neural e hormonal desses e de outros tecidos sensíveis a melatonina acionam uma série de adaptações fisiológicas às estações do ano. Torpor, hibernação e migração, bem como infertilidade, deposição de gordura e alterações nas taxas metabólicas e no apetite estão entre as respostas possíveis (HAZLERIGG *et al* 2001; DARDENTE *et al* 2003;).

O relógio do NSQ possui um mecanismo celular autônomo baseado na ativação de transcrições de uma série de genes conhecidos como genes do relógio, que compõe a base da função circadiana nos NSQs, mas também em tecidos periféricos (LINCOLN *et al.*, 2003).

Os genes *period* (*per1*, *2* e *3*) e *criptocromo* (*cry1* e *2*) são ativados por heterodímeros compostos por outros dois fatores circadianos CLOCK e BMAL1. As proteínas PER e CRY associam-se para reprimir a expressão dos genes *per* e *cry*, gerando assim um mecanismo do tipo alça de retroalimentação negativa. Esta alça determina um padrão cíclico da expressão gênica que apresenta uma periodicidade circadiana. Além disso, os genes *per1* e *per2* são sensíveis a estímulos fóticos transmitidos para os NSQs via aferências da retina. É esse mecanismo que garante a sincronização entre o oscilador circadiano endógeno e o dia solar que está, portanto, agindo como “zeitgeber” (HAZLERIGG *et al* 2001; DARDENTE *et al* 2003; LINCOLN *et al.*, 2003).

4.3 VIAS DO CONTROLE SAZONAL EM TESTÍCULOS DE CARNEIROS

Há evidências de que a prolactina atua diretamente nos testículos de carneiros junto com o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Juntos, esses hormônios parecem regular o ciclo testicular em carneiros adultos (LINCOLN *et al*, 2001). A secreção do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) do hipotálamo reflete mudanças circanuais sobre a liberação de LH e FSH (LEHMAN *et al* 1997; GERLACH e AURICH, 2000; LINCOLN *et al* 2001). Em resumo, pulsos de GnRH são sucedidos por pulsos de LH e pulsos de testosterona sucedem aqueles de LH produzindo amplitudes que diferem conforme a época do ano (RHIM *et al*, 1993). Isto implica que as relações e respostas entre as unidades

hipotálamo-hipófise e hipófise-gônadas são, sem dúvida alguma, influenciados pelas estações do ano.

Em algumas raças ovinas e de acordo com a latitude em que se encontram, o ciclo gonadal, como a função testicular, reflete um controle intrínseco em carneiros exibindo um ciclo testicular que dura cerca de um ano e assegura máximo desempenho reprodutivo no outono (HOWLES *et al* 1982; LINCOLN e CLARCK, 1998; EMSEN, 2005).

DICKSON e SANFORD (2005) observaram que machos da raça Suffolk, tiveram aumento na circunferência escrotal atingindo 36,1 cm, no outono, hemisfério norte. MILCZEWSKI (2008) observou no hemisfério sul, que machos Suffolk apresentaram, em média, 27,63 cm de circunferência escrotal, no inverno; enquanto que os animais na fase de maior circunferência escrotal apresentaram uma média de 37,67cm, no verão.

Esse aumento e diminuição no tamanho testicular são conseqüências de um fenômeno degenerativo que ocorre na espermatogênese e que provavelmente influencia na quantidade de espermatozóides liberados na luz dos túbulos seminíferos (HOCHEREAU de REVIERS *et al*, 1976).

4.4 MODIFICAÇÕES SAZONAIS NA ESPERMATOGÊNESE E HISTOLOGIA TESTICULAR

4.4.1 Fisiologia Testicular

O testículo é envolvido pela túnica albugínea que emite septos conjuntivos em direção ao mediastino. Estes septos formam lóbulos testiculares que apresentam inúmeros vasos sanguíneos e alojam os túbulos seminíferos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). No seu interior mostram epitélio germinativo ou seminífero

constituído por dois tipos de células, as de Sertoli que envolvem e nutrem as células germinativas formadoras de espermatozóides, e as da linhagem germinativa. Entre os túbulos seminíferos, nos septos ou logo abaixo da túnica albugínea, se localizam as células intersticiais de Leydig, produtoras de testosterona (RONDON *et al.*, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; LINO NETO *et al.*, 2005).

Como já mencionado, a função testicular normal depende da ação dos hormônios LH e FSH produzidos pela hipófise anterior, que por sua vez são regulados pelo GnRH sintetizado no hipotálamo. Quando se fala em função testicular, além desses dois hormônios, é importante citar também a testosterona (McLACHLAN *et al.* 1996).

O LH age nas células de Leydig na secreção de testosterona, que por sua vez é responsável pelas características sexuais masculinas (físicas e comportamentais). Seus receptores são capazes de detectar os níveis de testosterona suficientes para induzir a produção de andrógenos, e pelo mecanismo de retroalimentação na liberação das gonadotrofinas, atuando nos receptores androgênicos do epitélio seminífero para controlar a espermatogênese (JOHNSON e EVERITT, 2000; O'DONNEL *et al.*, 2001).

As altas concentrações intratesticulares de testosterona regulam as células de Sertoli, desempenhando importante papel na iniciação e manutenção da espermatogênese. Vale ressaltar que a testosterona regula também os primeiros estágios de desenvolvimento espermático, enquanto que o FSH regula os estágios de espermatogônia intermediária a espermátócito primário (KILGOUR *et al.*, 1994; JOHNSON e EVERITT, 2000; DICKSON e SANFORD, 2005).

Segundo FRANÇA e CHIARINI-GARCIA (2005) durante o processo proliferativo das células de Sertoli, o nível de FSH demonstra que o número destas

células pode ser reduzido ou aumentado, com conseqüente alteração no peso testicular e produção espermática. O FSH atua sobre as células de Sertoli na produção do fluido dos túbulos seminíferos, de inúmeras proteínas, de poliaminas e de lactato, que por sua vez estão envolvidos na regulação da espermatogênese. Neste processo a diferenciação e proliferação das espermatogônias promovem a formação e diferenciação dos espermatócitos em espermátides redondas e alongadas; e também é responsável pela ocorrência ou não de divisões mitóticas da espermatogônia, que colabora entre outros fatores com a eficiência da espermatogênese (KILGOUR *et al.* 1994; JOHNSON e EVERITT, 2000). Pela ação do FSH, as células de Sertoli realizam importante papel no desenvolvimento da gônada masculina com o aumento da massa testicular através da estimulação do desenvolvimento espermatogônico; no processo de retroalimentação de secreção das gonadotrofinas (inibina) e na regulação parácrina da função das células de Leydig (LINCOLN, 1989; JOHNSON e EVERITT, 2000; FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005).

4.4.2 Espermatogênese e Espermiogênese

A espermatogênese é o processo de diferenciação e maturação das células germinativas do interior dos túbulos seminíferos em espermatozóides, e se divide em duas etapas; a espermatocitogênese e a espermiogênese. Na espermatocitogênese algumas dessas células estão em constante mitose para repor o "pool" de células germinativas, como ocorre com a multiplicação das espermatogônias que originam os espermatócitos primários (diplóides) que sofrem meiose (ORTAVANT *et al.*, 1984; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; LINO NETO *et al.*; 2005). O espermatócito primário sofre duas divisões meióticas e origina os espermatócitos secundários;

estes dão origem as espermatídes, que possuem um conjunto haplóide de cromossomos. A espermiogênese caracteriza-se pela maturação das espermatídes, que envolve alterações nucleares, formação do acrossoma, desenvolvimento flagelar e redistribuição citoplasmática até formar o espermatozóide (JOHNSON e EVERITT, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; LINO NETO et al; 2005).

Ao longo da vida fetal e no pós-natal precoce o tamanho do testículo cresce lentamente. Isto é explicado pela limitada proliferação mitótica dos gonócitos que contribuem pouco para o aumento do tamanho testicular nesta fase. Já na puberdade, o aumento no tamanho testicular é rápido devido a vários fatores como a formação da luz nos túbulos seminíferos, o aumento da atividade e tamanho das células de Sertoli, o aumento da secreção endócrina das células de Leydig e à recuperação da atividade mitótica das células germinativas, as quais iniciam o processo de formação dos espermatozoides (JOHNSON e EVERITT, 2000).

Em ovinos adultos, o processo de divisão das espermatogônias inicia em uma seqüência de tempo e em uma posição precisa ao longo do túbulo seminífero. Isso leva a formação de ondas de maturação celular. Portanto, uma porção do túbulo que contém um tipo de associação celular é seguida por uma porção que contém um estágio precedente ou subsequente de tipo celular. Cada série completa de associação celular determina o ciclo dos túbulos seminíferos que inicia em intervalos regulares conforme a espécie. Em carneiros esse intervalo é de 10,57 dias (CARDOSO e QUEIROZ, 1988). Em um corte histológico do túbulo seminífero é possível observar oito tipos diferentes de associações constantes entre os tipos de células germinativas. O conjunto destes estágios cobre os 10,57 dias, sendo a duração da espermatogênese igual ao tempo transcorrido por cinco séries destes estágios, totalizando em média 42,28 dias.

Teoricamente, cada espermatogônia pode produzir 48 espermatócitos primários, porém, se observa uma produção de aproximadamente 24 espermatócitos, que pode ser diminuída para menos de dez durante a primavera em raças ovinas sazonais (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). COUROT (1967) observou que o principal estágio afetado é o de espermatogônia intermediária. Segundo JOHNSON e EVERITT (2000) em seis mitoses uma espermatogônia A1 produz 64 espermatócitos primários que poderiam gerar até 256 espermatozóides se não houvesse degeneração. SCHANBACHER e FORD (1979) verificaram que na espermiogênese ocorre pouca perda celular por degeneração devido a mudanças sazonais, uma vez que eles verificaram similaridade entre o número de espermátides redondas e espermátides maduras em carneiros expostos a dias longos. No processo de espermiogênese, as espermátides redondas se transformam em espermátides alongadas. Nesta fase, desenvolvem-se o acrossoma, a cauda e a peça intermediária que contém mitocôndrias importantes na propulsão. A espermiogênese se completa com a formação do espermatozóide e sua liberação da célula de Sertoli para a luz do túbulo pelo processo chamado de espermiação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A célula de Sertoli é uma das mais complexas do corpo animal, tanto estrutural como funcionalmente. As funções de suporte, proteção e suprimento nutricional dos espermatozóides as tornam elementos essenciais no processo espermatogênico. Elas se associam ao mesmo tempo com quatro diferentes tipos de células germinativas, com a membrana basal e com outras células de Sertoli, por isso propiciam as condições necessárias para a progressão e diferenciação das células germinativas durante a espermatogênese (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005). Assim, a influência sazonal na degeneração

natural e reversível das células de Sertoli, que acontece na fase de menor circunferência escrotal, parece influenciar a espermatogênese em carneiros, já que degenerações têm sido detectadas também nas células da linhagem germinativa como as espermatogônias e as espermátides (GASTEL *et al.* 1995; BIELLI *et al.*, 1999; JOHNSON *et al.*, 2000). Estes mecanismos de degeneração podem estar associados a modificações da morfologia da célula com diminuição de suas funções, que normalmente é um processo reversível (BRASILEIRO FILHO, 2004).

A célula de Sertoli possui uma forma colunar totalmente assimétrica. O seu núcleo é irregular e possui formato triangular que varia durante o ciclo seminífero determinando a arquitetura deste epitélio (COLE e CUPPS, 1984). O alto grau de plasticidade da célula se deve ao elaborado citoesqueleto que se permite alterar de configuração, adaptando-se à associação feita com as células germinativas (FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005).

Localizadas no interstício dos testículos, as células de Leydig constituem o principal componente endócrino deste órgão, sendo responsáveis por cerca de 95% da produção de testosterona circulante num indivíduo adulto (DELLA COLLETA e CARVALHO, 2005). Variações estruturais destas células também têm sido relatadas conforme a mudança fotoperiódica. Um aumento na quantidade de vesículas citoplasmáticas durante a fase de menor circunferência escrotal foi detectada, por exemplo, em carneiros da raça Corriedale (GASTEL *et al.*, 1995). Nesta fase, os níveis de testosterona encontram-se mais baixos do que no resto do ano; fato demonstrado tanto em Corriedale (GASTEL *et al.*, 1995, BIELLI *et al.*, 1999) como em outras raças de carneiros (SCHAMBACHER e FORD, 1979; LINCOLN *et al.*, 1990).

O estudo da histologia testicular e suas diversas combinações celulares entre diferentes épocas do ano geram informações importantes sobre o efeito da

sazonalidade na espermatogênese. Se essa modificação sazonal afeta a circunferência escrotal (SC) e, conseqüentemente, o volume testicular espera-se que ocorram mudanças profundas na atividade espermatogênica (LINCOLN *et al.* 1990). Uma redução significativa do volume testicular é devida, possivelmente, a um reflexo da diminuição da espermatogênese, pois 90% do volume desse órgão é composto por túbulos seminíferos (MILCZEWSKI, 2008).

Tais mudanças no peso e volume testicular, observadas por MILCZEWSKI (2008), como sendo devido às mudanças de luminosidade do ambiente são provavelmente conseqüência de fenômenos degenerativos dentro do processo de espermatogênese, pois, foi constatado que esse fenômeno afeta também a quantidade de espermatozóides secretados na luz dos túbulos seminíferos. Todavia, inferências quantitativas mais aprofundadas sobre a atividade espermática poderão ser feitas com o uso de técnicas de imunomarcações. A Vimentina, por exemplo, é um anticorpo monoclonal marcador de filamentos intermediários e por isso é amplamente usada na marcação de células de Sertoli (FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005). A função atribuída a esses inúmeros filamentos é a de proteger a célula contra estresse mecânico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005). A marcação das células de Sertoli ocorre porque estas possuem seu citoesqueleto formado por um extenso arranjo de filamentos intermediários que circunscrevem o núcleo e se estendem pelo citoplasma da célula e seus prolongamentos. A imunomarcação da célula de Sertoli por inteiro, possibilita caracterizá-la, medi-la e diferenciá-la das demais células presentes no epitélio germinativo; a marcação por vimentina, das células germinativas do epitélio do túbulo seminífero não ocorre pelo fato de tais células não possuírem filamentos

intermediários em sua composição (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005).

Como citado anteriormente, dentro do túbulo seminífero ocorre a espermatogênese, e para que este processo ocorra, as células do epitélio germinativo sofrem divisões celulares por mitose e meiose, diferenciações e maturações até a transformação final em espermatozóides (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), demonstrando assim que são células em constante ciclo celular.

Ki-67 é uma proteína nuclear presente em células proliferantes. O anticorpo monoclonal Ki-67, reconhece esta proteína associada ao núcleo celular que, em células em proliferação, é expressa em todas as fases ativas do ciclo celular (fases G1, S, G2 e M), mas são ausentes em células quiescentes (fase G0) (GERDES *et al*, 1984). Sua expressão começa a ser detectada na fase S do ciclo celular, aumenta na fase G2, e atinge seu pico na fase M. Após a divisão celular, a célula retorna a G1 e os níveis da proteína Ki-67 diminuem progressivamente (SASAKI *et al*, 1987; LIU e KLEIN-SZANTO, 2000; SOARES, 2005). Tal fato indica que o antígeno Ki-67 pode ser usado como um marcador para células em “fração de crescimento” (SCHLÜTER *et al*, 1993).

A atividade proliferativa de qualquer tecido ou neoplasia pode ser determinada pelo número de células em ciclo celular e o tempo que estas levam para completá-lo (BROWN e GATTER, 1990).

A taxa de proliferação compreende dois parâmetros: a fração de crescimento e o tempo necessário para que a célula complete seu ciclo celular. O Ki-67 apresenta uma vida média de menos de uma hora (BRUNO e DARZYNKIEWIKZ, 1992), portanto a expressão do Ki-67 fornece, somente, a

informação de estar ou não, a célula em ciclo celular, mas nada sobre a duração de seu ciclo (ARISAWA e MORAES, 1999).

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células que tenham completado seu ciclo celular. Este processo apresenta uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma seqüência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas (LEVINE *et al*, 1994; SOARES, 2005).

O ciclo celular é constituído por quatro fases distintas no ciclo celular: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período após a replicação do DNA (G2) e a fase mitótica (M) que culmina na divisão celular (LEVINE *et al*, 1994). As células fora do ciclo celular estão na chamada fase G0 e podem permanecer nesta fase por tempo indeterminado (ARISAWA e MORAES, 1999).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 INSERÇÃO DO PROJETO NA LINHA DE PESQUISA

Este estudo integra a linha de pesquisa de doutorado em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná realizado pela pesquisadora Viviane Milczewski, cujo projeto inicial intitulado: Influência Sazonal na flutuação de ovinos da raça Suffolk em latitude baixa: inter-relações entre circunferência escrotal, parâmetros morfológicos testiculares e testosterona sérica com a produção de sêmen; foi recentemente concluído (2008).

O projeto inicial consistiu do trabalho de campo com a criação dos animais e observação do tamanho testicular ao longo de um ano, realizado de abril de 2005 a maio de 2006; além disto os pesquisadores do primeiro projeto investigaram as inter-relações entre a circunferência escrotal, parâmetros morfológicos testiculares e testosterona sérica com a produção de sêmen. O material desta pesquisa consiste, portanto, no estudo morfométrico das amostras oriundas do experimento de campo, a seguir descrito, sendo este o segundo projeto conclusivo, nesta linha de pesquisa, que envolve as áreas da medicina veterinária e biotecnologia, através de estudos morfológicos, morfométricos e imunohistoquímicos.

5.2 PROCEDIMENTO DE CAMPO PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

No procedimento de campo, doze carneiros da raça Suffolk foram criados na fazenda experimental “Canguiri” da Universidade Federal do Paraná, localizada no Município de Pinhais – PR, a 893 m de altitude (IPARDES, 2005), sob a longitude 49°16'23"W e latitude 25°25'40"S, situada a 15 quilômetros da cidade de Curitiba. Nesta localidade, a amplitude do fotoperíodo é de 13 horas e 44 minutos de luz para

10 horas e 16 minutos de escuridão no solstício de verão e 10 horas e 33 minutos de luz para 13 horas e 27 minutos de escuridão no solstício de inverno, havendo uma diferença de três horas e 11 minutos entre o dia mais longo e o dia mais curto do ano. Os animais, com aproximadamente 12 meses de idade no início do experimento e massa corporal média de 51,51 Kg, foram mantidos em baia coletiva ao ar livre durante o dia e em aprisco durante a noite, sempre sob condição de luminosidade natural. O alimento era oferecido duas vezes ao dia e consistia de uma dieta balanceada a base de silagem de milho sendo o sal mineralizado e água fornecidos *ad libitum*. As medidas de circunferência escrotal eram realizadas quinzenalmente com auxílio de uma fita métrica flexível. Os animais foram abatidos quando atingiram a circunferência mínima (inverno, agosto de 2005; seis animais) e máxima (verão, março de 2006; seis animais). Maiores detalhes desta fase da pesquisa constam em MILCZEWSKI (2008). O testículo esquerdo de cada animal foi colhido imediatamente após a eutanásia (FIGURA 1a) e amostras representativas foram fixadas em solução de formalina 10% para a realização dos estudos histológicos.

5.3 MATERIAL

As amostras para a pesquisa foram retiradas dos testículos esquerdos de cada um dos 12 animais deste estudo, sendo seis de cada fase reprodutiva. De cada animal, foram colhidas três amostras de sítios distintos do parênquima testicular. Portanto, no total foram realizadas 18 amostras, referentes à fase na qual a circunferência escrotal apresentou menor tamanho, e 18 amostras da fase na qual a circunferência escrotal apresentava maior tamanho, totalizando 36 amostras, para serem submetidas ao processamento histológico por inclusão em parafina e

posterior análise morfométrica, detalhado a seguir. Para os estudos imunohistoquímicos, foram feitos microarranjos tissulares, cada um contendo nove amostras derivadas dos blocos de parafina original, no sentido de otimizar o uso dos reagentes (ver descrição em Materiais e Métodos, item 3.5). Desta forma, obteve-se todas as 36 amostras histológicas a serem analisadas, em apenas quatro lâminas (duas para cada fase). Destes blocos, foram feitos cortes histológicos de 3 μ m em micrótomo rotativo (Spencer), montados em lâminas eletricamente carregadas, especiais para técnicas imunohistoquímicas.

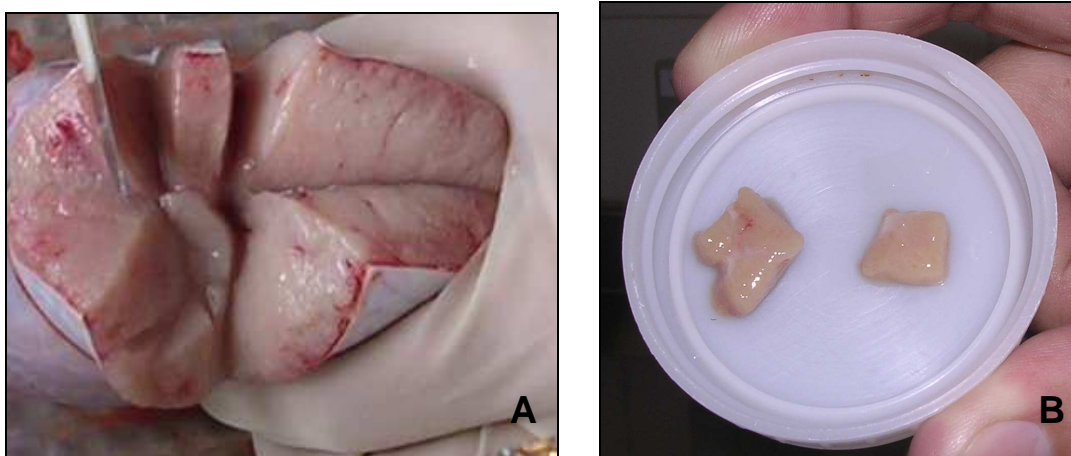


FIGURA 1 – TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. (A) ASPECTO MACROSCÓPICO DO TESTÍCULO E (B) AMOSTRAS DE APROXIMADAMENTE 1 X 1 X 0,5 CM DESTINADAS AOS ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS.

5.4 TÉCNICA HISTOLÓGICA

Após a coleta, as amostras testiculares foram imediatamente fixadas em solução de formalina a 10% tamponada, pelo período de 24 horas, e foram submetidas a processamento histológico de rotina (laboratório de histotecnologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná), desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico por uma hora cada, a partir de álcool 70% até álcool absoluto; seguiu-se diafanização, realizada em xilol, e infiltração e emblocagem em parafina histológica à 58° C. Foram realizados cortes histológicos

de 5µm, em micrótomo rotativo (Spencer), sendo as lâminas coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (H-E) (BEÇAK e PAULETTE, 1976; TOLOSA *et al.*, 2003).

5.5 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a técnica imunohistoquímica foram utilizadas lâminas eletricamente carregadas para melhor adesividade dos cortes (ImmunoSlide, EasyPath®); cortes histológicos de 3 µm de espessura, realizados a partir dos blocos de parafina contendo os microarranjos tissulares representativos das duas fases do ciclo reprodutivo, foram submetidos ao método imunohistoquímico padronizado na rotina do laboratório do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, conforme descrito a seguir:

- desparafinização dos cortes à temperatura de 58° C em xilol, reidratação do tecido em soluções alcoólicas de concentração decrescente; recuperação antigênica por calor, inibição da atividade endógena da peroxidase; incubação com os anticorpos primários; incubação com o polímero Envision®, revelação com o sistema de detecção do cromógeno DAB®; contracoloração com hematoxilina e montagem das lâminas.

A técnica imunohistoquímica foi empregada para caracterizar os diferentes tipos celulares no interior do túbulo seminífero. Portanto, optou-se pelos anticorpos monoclonais Ki-67 (MIB-1, DAKO, 1:200) e Placental Alkaline Phosphatase – PLAP (8A9, DAKO, 1:500) para marcar o epitélio germinativo, e pelo anticorpo monoclonal vimentina (V9, DAKO 1:1000), para as células de Sertoli.

5.6 ESTUDOS MORFOMÉTRICOS

As avaliações morfométricas, realizadas com o auxílio do software Image-Pro[®] Discovery, Media Cybernetics, 2005 e do microscópio Olympus BX 50, foram voltadas para parâmetros do trofismo das estruturas seminíferas nas duas fases distintas da reprodução. Este software apresenta em seu programa, a possibilidade de dimensionar o tamanho da área a ser analisada. Quando se determina o tamanho desta área, o programa define esta, como a medida padrão para as próximas análises.

Todos os parâmetros morfométricos estudados tiveram os dados colhidos a partir da observação microscópica de cada uma das 36 amostras histológicas: 18 de cada fase reprodutiva, provenientes de seis animais em cada fase. Para cada uma das amostras foram avaliados 30 túbulos seminíferos, totalizando 540 túbulos por fase reprodutiva.

As observações realizadas consistiram na quantificação de:

1. O número de túbulos seminíferos/área pré-estabelecida (FIGURA 2);
2. O diâmetro dos túbulos seminíferos (FIGURA 3);
3. A espessura do epitélio germinativo (FIGURA 4);
4. O número de camadas celulares do epitélio germinativo (FIGURA 5);
5. O número de espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozóides e de células de Sertoli por túbulo seminífero (FIGURA 6);
6. O número de células do epitélio germinativo com imunocoloração positiva para o Anticorpo Monoclonal Ki-67, por túbulo seminífero (FIGURA 7);
7. O número de células do túbulo seminífero com imunocoloração positiva para o Anticorpo Monoclonal Vimentina, por túbulo seminífero (FIGURA 8).

As figuras a seguir são demonstrações de como as análises morfométricas foram efetuadas nas lâminas contendo cortes histológicos dos testículos de carneiros Suffolk.

5.6.1. Número de túbulos seminíferos

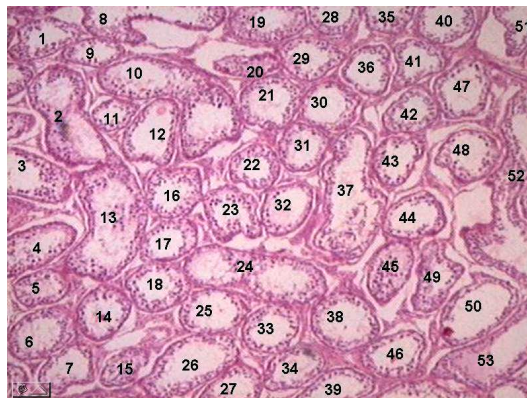


FIGURA 2: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO PARA CONTAGEM DO NÚMERO DE TÚBULOS SEMINÍFEROS. 40X.

Depois de estabelecida a área a ser analisada e padronizada para as demais avaliações morfométricas, como citado acima, os túbulos seminíferos foram contados um a um e numerados pelo software utilizado.

5.6.2. Diâmetros dos túbulos seminíferos:

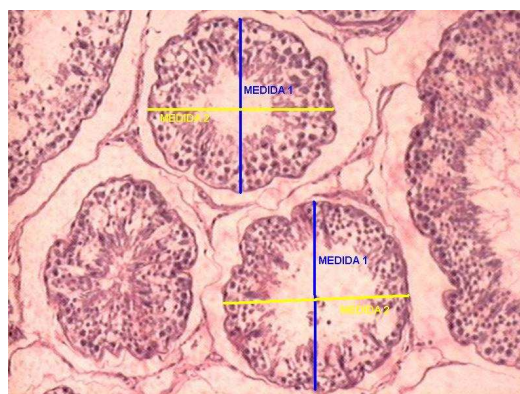


FIGURA 3: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO PARA MEDIR O DIÂMETRO DO TÚBULO. 100X.

Para medir o diâmetro dos túbulos seminíferos, procuraram-se túbulos em corte transversal, independente da luz do túbulo e foram feitas duas medidas, para se obter uma média.

5.6.3 Espessura do epitélio germinativo:

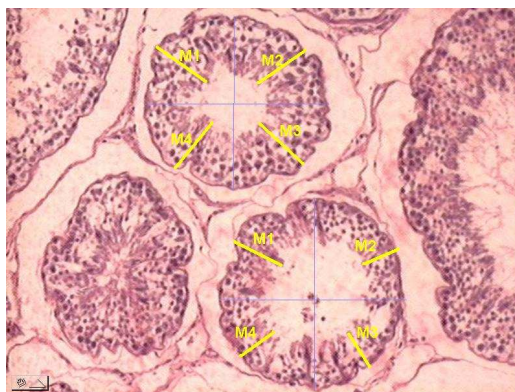


FIGURA 4: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO PARA MEDIR A ESPESSURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO. 100X.

A espessura do epitélio germinativo foi determinada através da média de quatro medidas de espessura aparentemente homogêneas, nos túbulos em corte transversal.

5.6.4. Número de camadas do epitélio germinativo:



FIGURA 5: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO PARA NUMERAR AS CAMADAS CELULARES DO EPITÉLIO GERMINATIVO 400X

A marcação do número de camadas celulares foi realizada com a contagem manual de cada tipo celular diferente dentro do epitélio germinativo do túbulo seminífero.

5.6.5. Número de cada tipo celular: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides, células de Sertoli:

As células do epitélio germinativo foram identificadas e contadas pelas suas características morfológicas.

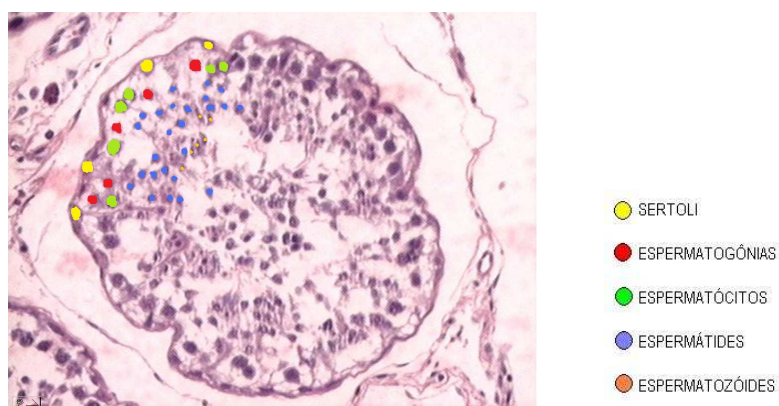


FIGURA 6: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO PARA CONTAR DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO. 400X.

Nesta contagem, a marcação foi feita com uma cor diferente para cada tipo celular diferente. Depois de marcadas, as células foram contadas automaticamente pelo software.

Os preparados imunohistoquímicos foram avaliados morfometricamente, através do mesmo software supracitado.

5.6.6. Número de células do epitélio germinativo com imunocoloração positiva para o Anticorpo Monoclonal Ki-67, por túbulo seminífero.

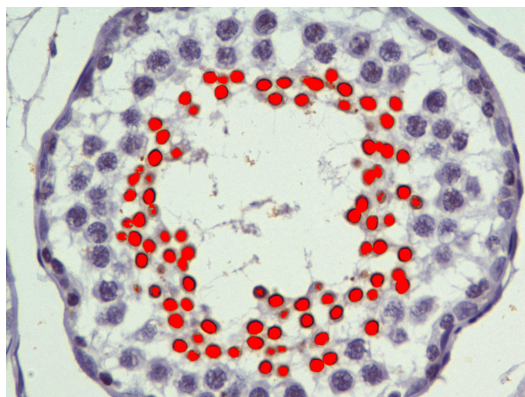


FIGURA 7: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO DAS CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO CELULAR COM IMUNOCOLORAÇÃO POSITIVA PARA O ANTICORPO MONOCLONAL Ki-67. 400X

Esta marcação foi feita automaticamente pelo software, apenas nas células que reagiram ao anticorpo monoclonal, durante a técnica imunohistoquímica, ou seja, nas células Ki-67 positivas.

5.6.7. Número de células do túbulo seminífero com imunocoloração positiva para o Anticorpo Monoclonal vimentina, por túbulo seminífero:

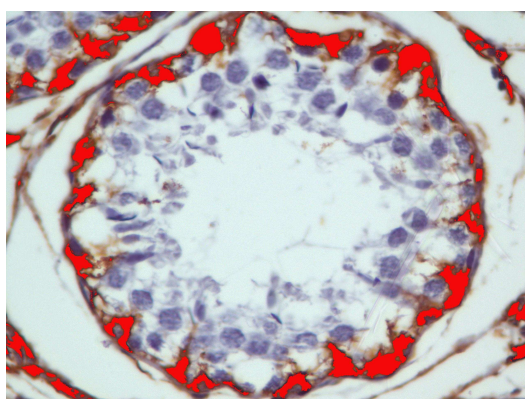


FIGURA 8: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI COM IMUNOCOLORAÇÃO POSITIVA PARA O ANTICORPO MONOCLONAL VIMENTINA. 400X

Esta marcação foi feita automaticamente pelo software utilizado, nas células que reagiram positivamente ao anticorpo monoclonal vimentina.

5.7 ESTUDOS ESTATÍSTICOS

Para a análise dos resultados, os parâmetros de trofismo seminífero de ovinos foram comparados, para os grupo das fases de menor e maior circunferência escrotal. Para os dados morfométricos correspondentes a medidas de diâmetros e espessuras, foram avaliados através do método ANOVA (Análise de Variância). O Teste de Tukey foi aplicado para contrastar os valores obtidos por ANOVA, sempre que os p -valores fossem menores que 5% ($p < 0,05$). Para os dados correspondentes à contagem numérica foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os valores foram considerados significativos quando o resultado indicasse p -valores menores que 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico R, disponível gratuitamente na Internet (<http://cran-r.c3sl.ufpr.br>).

6 RESULTADOS

6.1 ASPECTOS HISTOLÓGICOS

Os estudos histológicos demonstraram uma diferença significativa entre as estruturas testiculares analisadas durante as duas fases do ciclo reprodutivo, demonstrando a influência, em nível celular, do fotoperíodo sobre os carneiros da raça Suffolk. Nota-se maior proliferação celular ocorrendo no momento de maior tamanho testicular (verão de 2006) do que na fase de menor circunferência escrotal (inverno de 2005) (FIGURA 9).

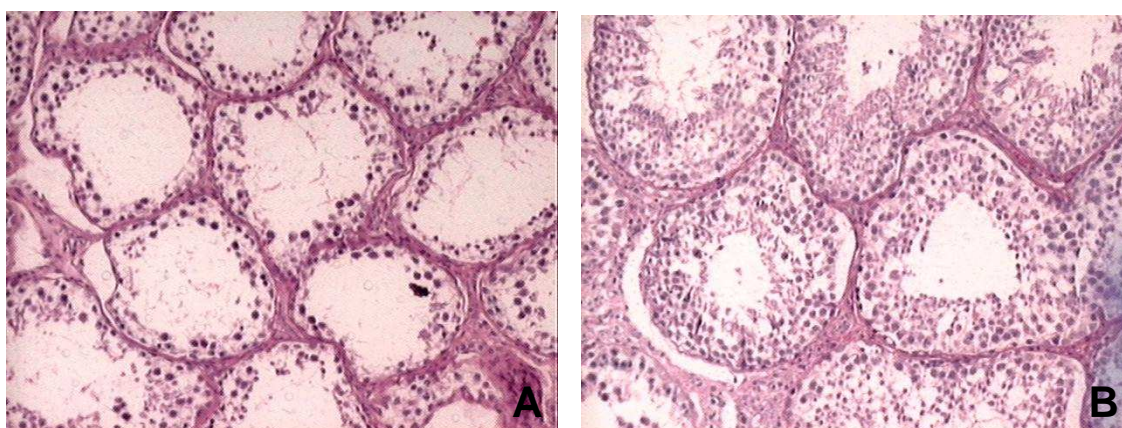


FIGURA 9 – TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. ASPECTOS HISTOLÓGICOS DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS NAS FASES DE MENOR (A) E MAIOR (B) CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL. 100X

6.2 DESCRIÇÃO DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO E CÉLULAS DE SERTOLI

As análises histológicas e imunohistoquímicas dos túbulos seminíferos permitiram caracterizar morfologicamente as células de Sertoli e as células do epitélio germinativo.

As células de Sertoli possuem um núcleo triangular próximo à base do túbulo seminífero facilmente visualizado quando corado em H-E. Porém o uso do anticorpo monoclonal vimentina, utilizado na técnica imunohistoquímica, permitiu a

visualização completa da célula. Esta possui um citoplasma irregular que se estende da lâmina basal do epitélio até a luz do túbulo seminífero, e que interage com as células da linhagem germinativa, como demonstrado na FIGURA 11.

As espermatogônias são células pequenas, próximas à lâmina basal do epitélio, que geralmente se apresentam no mesmo nível do núcleo das células de Sertoli, e quando coradas em H-E, possuem uma coloração roxa mais intensa que as demais células do epitélio germinativo.

Os espermatócitos são de fácil identificação, pois são as maiores células do epitélio germinativo. Esta célula se divide em duas categorias, os espermatócitos primários, nos quais seus núcleos apresentam cromossomos visíveis; e os espermatócitos secundários, de difícil visualização em um corte histológico testicular, pois são células que se dividem muito rapidamente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O espermatócito primário é facilmente visualizado, porque além do seu tamanho, quando corado em H-E, o seu citoplasma claro realça os cromossomos, permitindo a identificação desta célula.

As espermátides são as menores células do epitélio germinativo, e se localizam próximo à luz do túbulo seminífero. Possuem variações conformacionais variando de redondas a alongadas, pois sofrem processo de diferenciação na formação do espermatozóide. Quando coradas em H-E, possuem uma coloração roxa mais escura. Na técnica imunohistoquímica utilizada com o anticorpo monoclonal Ki-67, que corou as espermátides, nota-se claramente o tamanho pequeno e o formato redondo na maioria das vezes, desta célula (FIGURA 12).

Os espermatozóides são as células mais diferenciadas do epitélio germinativo. São células alongadas, que apresentam flagelo e acrossoma. Geralmente estão localizados na luz do túbulo seminífero.

6.3 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DA QUANTIDADE DE CÉLULAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO.

Durante a fase de menor circunferência escrotal, momento em que os testículos involuíram, [valores médios de 27,41 cm de circunferência escrotal e volume testicular de 218 cm³; MILCZEWSKI (2008)], a análise de cortes transversais dos túbulos seminíferos revelou em média, 11,23 células de Sertoli, 27,99 espermatogônias, 24,96 espermatócitos e 32,94 espermátides e espermatozóides por túbulo.

Já na fase de maior circunferência escrotal, quando o maior valor médio de circunferência escrotal foi verificado [valores médios de 35,83 cm de circunferência escrotal e volume testicular de 504 cm³; MILCZEWSKI (2008)] os números celulares obtiveram os seguintes valores: 11,53 células de Sertoli, 40,89 espermatogônias, 38,61 espermatócitos e 76,37 espermátides e espermatozóides por túbulo.

Estes valores nos permitem notar que houve um aumento no número de células da fase de menor circunferência escrotal para a fase de maior circunferência escrotal de exatamente 2,7% para as células de Sertoli, 46,09% para as espermatogônias, 54,69% para os espermatócitos e de 131,85% para as espermátides alongadas e espermatozóides.

Os valores médios das fases reprodutivas de maior e menor circunferência escrotal constam na TABELA 1 e a relação das células germinativas e células de Sertoli nas duas fases estão evidenciadas na FIGURA 10. Os resultados da TABELA 1 e da FIGURA 10 resumem o conjunto de dados contidos no Apêndice 1.

TABELA 1: VALORES MÉDIOS REFERENTES À QUANTIDADE DE CÉLULAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO EM CARNEIROS SUFFOLK NAS FASES DE MENOR E MAIOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (SC), ACOMPANHADO DO CÁLCULO DE p .

	Sertoli	Espermatogônia	Espermatócito	Espermátides e Espermatozóides
Fase de menor circunferência escrotal (inverno 2005)	11,23	27,99	24,96	32,94
Fase de maior circunferência escrotal (verão 2006)	11,53	40,89	38,61	76,37
p	= 0,1920	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Desvio padrão	0,21	9,12	9,65	30,71

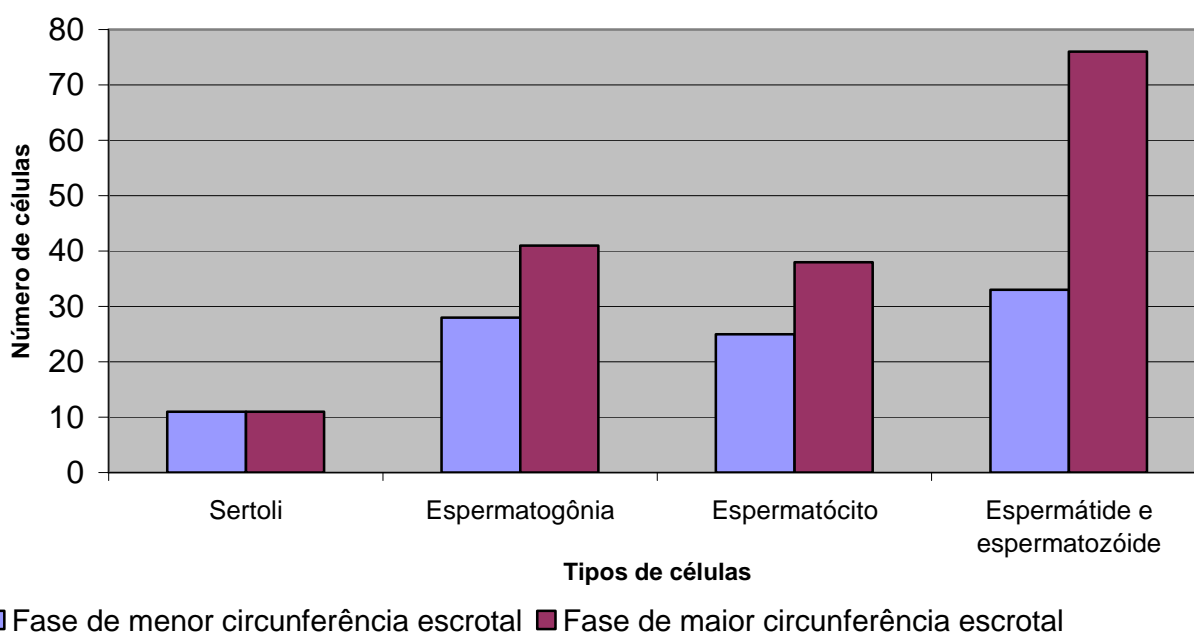


FIGURA 10: MÉDIA DE CÉLULAS DO EPITÉLIO GERMINATIVO (TROFISMO) POR TÚBULO SEMINÍFERO DE CARNEIROS SUFFOLK NAS FASES DE MENOR E MAIOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL

Conforme mostra a Tabela 1, as análises dos resultados obtidos entre as duas estações reprodutivas demonstram que não houve diferença significativa no número de células de Sertoli ($p = 0,1920$). Todavia, os demais parâmetros morfométricos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), ou

seja, os maiores valores foram encontrados durante a fase de maior circunferência escrotal desses animais.

6.4 VALORES MORFOMÉTRICOS DO DIÂMETRO DO TÚBULO SEMINÍFERO, DA ESPESSURA DO EPITÉLIO GERMINATIVO E DO NÚMERO DE CAMADAS.

É interessante notar que o diâmetro dos túbulos seminíferos variaram significativamente entre as duas fases reprodutivas apresentando, em média, 1,32 vezes maiores no fim do verão (fase de maior circunferência escrotal) do que no inverno (fase de menor circunferência escrotal). Na fase de maior circunferência escrotal, os cortes transversais dos túbulos seminíferos obtiveram em média, 65 μm de espessura do epitélio germinativo e 5 camadas celulares. Já na fase de menor circunferência escrotal, a espessura do epitélio foi de aproximadamente 47 μm e 4 camadas celulares (TABELA 2). Assim, para um crescimento médio de 30,71% na circunferência escrotal no inverno houve um aumento médio correspondente de 32,03% no diâmetro dos túbulos seminíferos e 37,76% na espessura média das camadas celulares dos túbulos.

TABELA 2 – VALORES MÉDIOS DA CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (SC); DO DIÂMETRO TUBULAR, ESPESSURA DA CAMADA CELULAR E NÚMERO DE CAMADA CELULARES DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE CARNEIROS SUFFOLK NAS FASES DE MENOR E MAIOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL, ACOMPANHADO DO CÁLCULO DE p .

	SC (cm)	Diâmetro túbulo (μm)	Espessura da camada celular (μm)	Nº camadas
Fase de menor circunferência escrotal (inverno 2005)	27,41	180,46	47,59	4,42
Fase de maior circunferência escrotal (verão 2006)	35,83	238,27	65,56	5,95
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Desvio padrão	5,95384	40,8778	12,7067	1,08187

6.5 ASPECTO IMUNOHISTOQUÍMICO

Com o uso do anticorpo monoclonal Vimentina para marcar as células de Sertoli por inteiro, obteve-se uma contagem mais exata destas células (FIGURA 11). Esta técnica corrobora com os resultados encontrados nas análises histológicas avaliadas morfometricamente mostradas anteriormente.

Pela análise estatística de Kruskal-Wallis realizada com os valores obtidos através da imunohistoquímica foi possível confirmar o fato de que não houve diferença significativa para as células de Sertoli, as quais apresentaram um número médio de 13,16 células por túbulo, durante a fase de menor circunferência escrotal; e de 13,24 células por túbulo na fase de maior circunferência escrotal (p -value = 0,00137).

É importante ressaltar que esta técnica permitiu visualizar com precisão as alterações no tamanho do citoplasma e na conformação da célula de Sertoli, durante as duas fases. A degeneração que torna a célula menor e menos trófica em termos estruturais durante a fase de menor circunferência escrotal, ocorre porque não há interação de muitas células germinativas e pode ser notada claramente na FIGURA 11A . Em contraposição, a FIGURA 11B, demonstra que a célula de Sertoli da fase de maior circunferência escrotal, apresenta um tamanho muito maior e seu citoplasma hipertrófico interage com as demais células do epitélio germinativo.

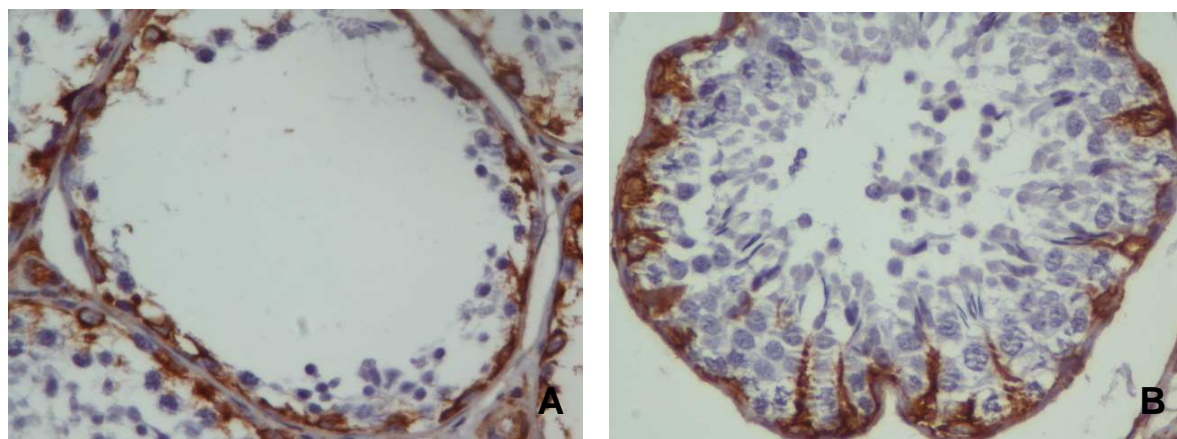


FIGURA 11: TESTICULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE SERTOLI PELO ANTICORPO VIMENTINA NAS FASES DE MENOR (A) E MAIOR (B) CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL. 400X.

A técnica imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal Ki-67 permitiu caracterizar de forma clara a diferença de produção espermática entre as duas fases reprodutivas, já que os alvos foram as células proliferativas, neste caso, as espermatídes. O Ki-67 reage a um antígeno que está associado ao núcleo de células proliferativas que se encontram nas fases ativas do ciclo celular. Neste estudo, as células do epitélio germinativo que reagiram a tal anticorpo, foram apenas as espermatídes, demonstrando assim um índice proliferativo maior que as demais células deste epitélio.

Os dados encontrados revelam que durante a fase de menor circunferência escrotal, apresentou em média, 47 espermatídes por túbulo seminífero; enquanto que na fase de maior circunferência escrotal este número foi em média de 147 espermatídes por túbulo, mostrando um aumento de 212,76% no número de células. Estes resultados mostraram-se estatisticamente significativos ($p\text{-value} < 2.2\text{e-}16$). Esta diferença é notada na FIGURA 12 onde é possível visualizar as espermatídes marcadas pelo Ki-67 nas duas fases reprodutivas.

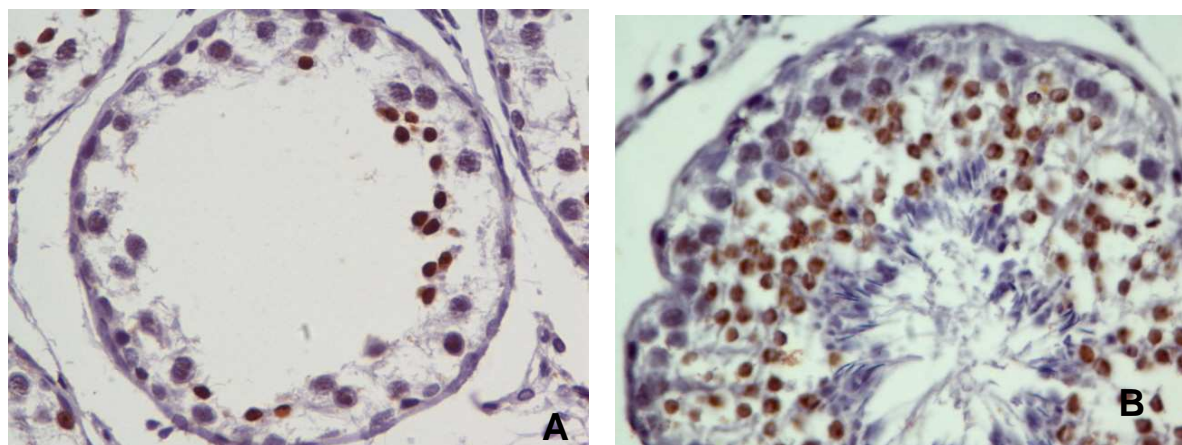


FIGURA 12: TESTÍCULO DE CARNEIRO SUFFOLK. MARCAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS ESPERMÁTIDES DA LINHAGEM GERMINATIVA PELO ANTICORPO MONOCLONAL Ki-67 NAS FASES DE MENOR (A) E MAIOR (B) CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL. 400X.

TABELA 3: MÉDIA DE CÉLULAS DE SERTOLI MARCADAS PELO ANTICORPO VIM (VIMENTINA) E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS ESPERMÁTIDES MARCADAS PELO ANTICORPO Ki-67 NAS FASES DE MENOR E MAIOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (SC), ACOMPANHADO DO CÁLCULO DE p .

	VIM (Sertoli)	Ki-67(Espermátides)
Fase de menor circunferência escrotal	13,16	47,4
Fase de maior circunferência escrotal	13,24	147,72
p	= 0,00137	< 0,001
Desvio padrão	0,06	70,94

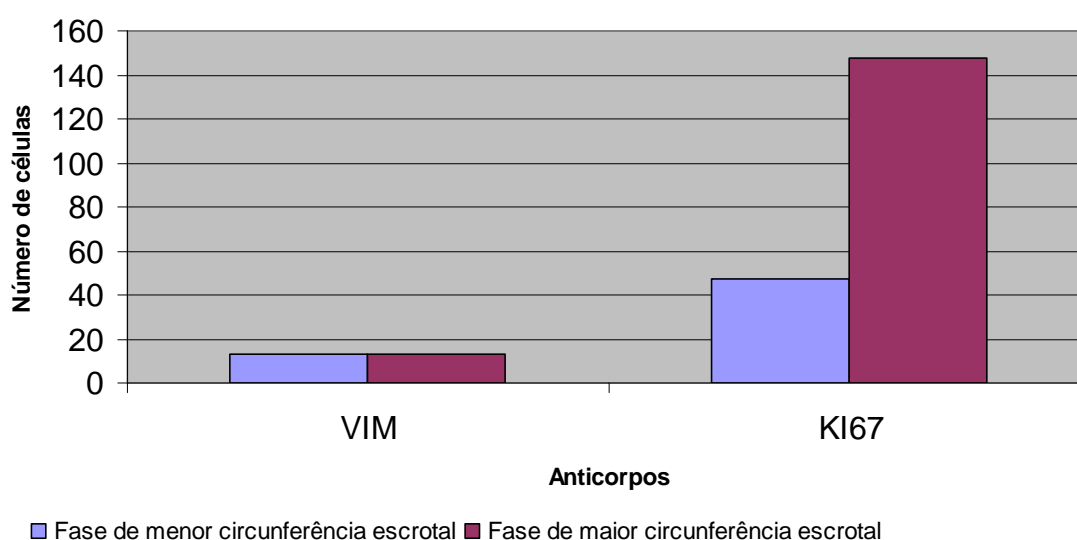


FIGURA 13: MÉDIA DE CÉLULAS DE SERTOLI MARCADAS PELO ANTICORPO VIM (VIMENTINA) E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS ESPERMÁTIDES MARCADAS PELO ANTICORPO Ki-67 NAS FASES DE MENOR E MAIOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL.

7 DISCUSSÃO

Os carneiros da raça Suffolk apresentam como uma das características reprodutivas, a influência sazonal do fotoperíodo em seu ciclo reprodutivo. O material testicular utilizado no presente estudo nos permitiu confirmar tais afirmações.

A diferença entre as fases reprodutivas foi caracterizada macroscopicamente a princípio pelo volume e circunferência escrotal dos animais, em um estudo preliminar realizado por MILCZEWSKI (2008). Porém foram as análises mais aprofundadas a níveis microscópicos realizadas nos túbulos seminíferos destes animais, que possibilitam afirmar tal desigualdade. Os resultados encontrados em ambas as fases, condizem com os resultados encontrados na literatura, que relatam estas diferenças.

Autores como PINEDA (1989), CHEMINAU e COGNIÉ (1991) e MARTIN *et al* (2002); caracterizam os ovinos Suffolk como animais originários de climas frios, mais especificamente do hemisfério norte, que têm uma estação reprodutiva bem definida por um fotoperíodo regular durante todo ano. Porém, segundo HULET e SHELTON (1988) e WOODFILL *et al* (1994), uma mudança no regime fotoperiódico pode levar a alterações na fase inicial ou até mesmo na duração da atividade reprodutiva, quando o animal é deslocado de seu local de origem dependendo da latitude. Os carneiros Suffolk estudados neste trabalho, também apresentaram uma diferenciação estrutural e morfológica caracterizando duas fases distintas do ciclo reprodutivo, no estado do Paraná, Brasil, hemisfério sul.

A estação reprodutiva das raças estacionais ocorre quando há mudança de dias longos para dias curtos, fato que ocorre no final do verão e início do outono; justamente como ocorreu com os animais aqui estudados, que apresentaram a fase de maior circunferência escrotal em março; mês este que no hemisfério sul

caracteriza o fim do verão e início do outono. Esta fase é caracterizada pelo crescimento testicular e um aumento na produção de sêmen, que se torna de melhor qualidade, conforme descrito por autores como LINCOLN *et al.* (1990) e CHEMINEAU e COGNIÉ, (1991).

Já a fase de menor circunferência escrotal é caracterizada pela transição de dias curtos para dias longos, ou seja, quando naturalmente ocorre um aumento da fotofase, momento que se inicia no fim do inverno no hemisfério sul. É nesta fase que a atividade espermática diminui, mas não cessa totalmente (HULET e SHELTON, 1988), fato esse também verificado nos animais do presente estudo (MILCZEWSKI, 2008). Os carneiros apresentaram esta fase no mês de agosto, corroborando com os dados encontrados na literatura.

Na fase em que um carneiro Suffolk apresentou aumento na circunferência escrotal, houve também um aumento no volume/peso testicular, como foi detectado por MILCZEWSKI (2008), e também nas estruturas microscópicas analisadas nos cortes histológicos contendo os túbulos seminíferos destes animais.

Com este estudo morfométrico detalhado nos túbulos seminíferos, obtiveram-se dados como as variações que ocorrem em diferentes níveis microscópicos intratubulares, tais como o diâmetro dos túbulos nas duas fases, a espessura do epitélio germinativo, número de camadas celulares e o número de células dentro do túbulo seminífero. De acordo com SCHAMBACHER e FORD (1979), estudos morfológicos têm demonstrado uma variação no diâmetro dos túbulos em várias raças de ovinos, sobretudo aquelas originárias de altas latitudes. Na presente pesquisa, a variação do diâmetro dos túbulos foi significativa ($p < 0,001$), com os valores de 180,46 μm para a fase de menor circunferência escrotal e de 238,27 μm para a fase de maior circunferência escrotal, em média. Estes valores

demonstram que houve um aumento de 32,04% da fase de menor circunferência escrotal em relação à fase de maior circunferência escrotal.

Outro dado importante encontrado no presente estudo foi a variação na espessura do epitélio germinativo, que aumentou em 37,76% de uma fase para outra, o que indica não só um aumento no número de células do epitélio germinativo mas também no número de camadas celulares.

A diferença estatística para o número de camadas celulares por túbulo seminífero também foi significativa ($p < 0,001$), o resultado encontrado obteve um número médio de 4,42 camadas para a fase de menor circunferência escrotal, e de 5,95 camadas para a fase de maior circunferência escrotal, demonstrando um aumento de 34,53% de uma fase para outra.

Na fase de menor circunferência escrotal, de acordo com os resultados encontrados, quase não houve a presença de espermatídes e espermatozóides, denotando a diminuição da espermatogênese. Autores como LINCOLN e SHORT (1980) e HOCHEREAU-DE REVIERS *et al.* (1985) relatam em suas pesquisas que na fase de menor circunferência escrotal a diminuição da produção de espermatozóides é muito evidente.

As espermatídes e os espermatozóides foram as células que apresentaram maior diferença em número entre as fases do ciclo reprodutivo, quando comparadas com as demais células do epitélio germinativo.

Segundo JOHNSON e EVERITT (2000) a degeneração do epitélio germinativo pode ser quantificada através da contagem do número de células germinativas em vários estágios de desenvolvimento ao longo da espermatogênese. Neste estudo constatou-se tal fato, comparando o número de células do epitélio germinativo em ambas as fases do ciclo reprodutivo. As diferenças foram

estatisticamente significativas ($p < 0,001$) para a média das células do epitélio germinativo. A principal diferença ocorreu entre as espermatídes e espermatozóides, na qual a fase de maior circunferência escrotal ocorrida no final do verão em março de 2006, obteve um aumento de 131,85% em relação a fase de menor circunferência escrotal, que ocorreu no inverno em agosto de 2005. Este fato foi comprovado pela análise imunohistoquímica feita com o anticorpo monoclonal Ki-67 que marcou com eficácia as espermatídes, possibilitando notar claramente o aumento da fase de menor circunferência escrotal em relação à fase de maior circunferência escrotal que foi de 212,76 %, diferença estatística significativa ($p < 0,001$) nestas reações.

As demais células do epitélio germinativo também apresentaram diferença entre as fases, comprovando que os túbulos seminíferos da fase ocorrida no final do verão em março de 2006, quando os animais apresentaram maior circunferência escrotal, tiveram uma quantificação celular do epitélio germinativo muito maior que a fase em que os animais apresentaram menor circunferência escrotal, fato ocorrido no inverno em agosto de 2005. Além das espermatídes, as células que apresentaram maior diferença entre as fases, foram os espermatócitos e as espermatogônias, com aumento de 54,69% e 46,09% da fase de menor para a fase de maior circunferência escrotal, respectivamente. Estes dados corroboram com autores como SCHANBACHER e FORD (1979), que levantam a hipótese de que o fotoperíodo regula a espermatogênese interferindo no número de espermatócitos que completam a meiose, ou controlando o número de espermatogônias que entram no ciclo espermático e ainda alterando a taxa de degeneração celular durante o processo.

Em todos os parâmetros avaliados nos túbulos seminíferos, foi possível notar que a fase de menor circunferência escrotal apresentou valores significativamente menores que a fase de maior circunferência escrotal, entretanto o mesmo não ocorreu com as células de Sertoli, pois o valor apresentado foi estatisticamente o mesmo ($p=0,1920$) em ambas as fases, tanto nas análises morfológicas quanto nas imunohistoquímicas.

Para realizar o ensaio imunohistoquímico deste estudo, seriam necessários anticorpos específicos para as diferentes células do túbulo seminífero; no entanto, não foi encontrado nenhum anticorpo específico para as células do epitélio germinativo, somente para as células de Sertoli.

Para resolver esta questão, foram testados dois anticorpos, o Ki-67 e o Placental Alkaline Phosphatase (PLAP). O primeiro anticorpo serviria para marcar as células em proliferação celular, experiência na qual obteve-se sucesso.

Já o PLAP, é um marcador de células tumorais do epitélio germinativo, ou do epitélio germinativo em testículos fetais, porém como já citado acima, esta experiência foi somente um teste, e seu resultado negativo já era esperado. Portanto, optou-se pelo anticorpo monoclonal Ki-67 para o epitélio germinativo, mesmo sabendo que poderia marcar apenas um, ou alguns tipos celulares, e pelo anticorpo monoclonal vimentina, para as células de Sertoli.

Para FRANÇA e CHIARINI-GARCIA (2005), a vimentina cora a célula de Sertoli por inteiro, no interior do túbulo seminífero, distinguindo-as das células do epitélio germinativo que não reagem com este anticorpo. Neste estudo, o uso da vimentina atuou de forma precisa sobre estas células, o que possibilitou contá-las e compará-las com os resultados encontrados nas análises morfométricas feitas em H-E, na qual obteve-se o mesmo número de células em ambas as fases, ou seja, de

11,23 em média, na fase de menor circunferência escrotal e de 11,53 em média, na fase de maior circunferência escrotal, por túbulo seminífero. Tal fato condiz com os relatos feitos por autores como HOCHEREAU-DE REVIERS *et al* (1985) e BIELLI *et al* (1999) que afirmam que o número destas células não muda durante toda a vida do animal, mas discorda de FRANÇA e CHIARINI-GARCIA (2005) que relatam que o número destas células pode aumentar ou diminuir, conforme o nível de FSH, durante o processo proliferativo.

O que a vimentina permitiu constatar com precisão, foi que ocorre uma alteração de tamanho no citoplasma e, portanto, na conformação da célula durante as duas fases. Na fase de menor circunferência escrotal, ocorre uma degeneração que torna a célula menor e menos trófica porque não há muitas células germinativas interagindo com a Sertoli; como ocorreu com WALLGREN *et al*, (1993) e GASTEL *et al*, (1995) que afirmaram que em termos estruturais um certo grau de degeneração ocorre em células de Sertoli durante a fase de menor circunferência escrotal, em seus trabalhos. Já na fase de maior circunferência escrotal, a célula apresenta um tamanho muito maior e seu citoplasma mais trófico interage com as demais células do epitélio germinativo que já possui todas as células responsáveis pela espermatogênese. Isto permite notar o alto grau de plasticidade desta célula devido ao fato de que o elaborado citoesqueleto altera sua configuração, adaptando-se à associação feita com as células germinativas conforme FRANÇA e CHIARINI-GARCIA (2005).

No epitélio germinativo, neste estudo, o anticorpo monoclonal Ki-67 marcou apenas as espermátides, fato este inesperado, pois era esperado que as espermatogônias e os espermatócitos também fossem coradas, como afirmam SCHANBACHER e FORD (1979), que relatam que o número de espermatócitos que

completam a meiose, ou o número de espermatogônias que entram no ciclo espermático é regulado pelo fotoperíodo.

De acordo com GERDES *et al* (1984) que foi quem obteve este anticorpo pela primeira vez, e descreveu sua atuação, o Ki-67 reconhece a proteína associada ao núcleo celular que, em células em proliferação, é expressa em todas as fases ativas do ciclo celular (fases G1, S, G2 e M), mas são ausentes em células quiescentes (fase G0).

E segundo BROWN e GATTER (1990) e SOARES (2005), a atividade proliferativa de qualquer tecido, ou neoplasia, pode ser determinada pela taxa de crescimento isto é, o número de células em ciclo e o tempo que estas levam para completá-lo.

Como o Ki-67 apresenta uma vida média de menos de uma hora (BRUNO e DARZYNKIEWIKZ,1992) a expressão do Ki-67 fornece, somente, a informação de a célula estar ou não em ciclo celular, mas nada sobre sua duração (SOARES, 2005).

Portanto pode-se dizer que neste estudo, as hipóteses levantadas sobre as demais células do epitélio germinativo, principalmente as espermatogônias, as quais era esperada uma forte marcação pelo seu perfil proliferativo, é a de que estas células terminaram seu ciclo celular e encontram-se em estado quiescente, e que as espermátides além de estarem em proliferação, encontram-se nas fases G2 e M do ciclo celular, devido a alta expressão do Ki-67, corroborando com SASAKI *et al* (1987) que afirma que a expressão antigênica aumenta com a progressão do ciclo celular, alcançando um pico nas fases G2 e M.

As espermátides claramente marcadas pelo Ki-67 possibilitam notar a evolução da espermatogênese dentro do túbulo seminífero. São estas células que

dão início ao processo de espermiogênese, e é nesta fase que as espermatídes passam por transformações até que se tornem espermatozóides.

Nas análises morfométricas de contagem celular do epitélio germinativo, foram estas células, espermatídes e espermatozóides, que apresentaram maior diferença entre as duas fases do ciclo reprodutivo. Obteve-se um aumento de 212,76% da fase de menor circunferência escrotal para a fase de maior circunferência escrotal nas avaliações imunohistoquímicas com o Ki-67, e de 131,85% para as avaliações morfológicas. É este aumento que nos permite afirmar através da morfometria, que a fase de menor circunferência escrotal não possui uma produção espermática tão eficaz, quando comparada à fase de maior circunferência escrotal.

8 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu distinguir as fases do ciclo reprodutivo de carneiros Suffolk através de análises morfológicas, morfométricas e imunohistoquímicas, que possibilitaram constatar que:

- A fase de maior circunferência escrotal apresenta um número maior de células do epitélio germinativo do túbulo seminífero, quando comparado ao número das mesmas células na fase de menor circunferência escrotal.
- Esta diferença não ocorre com o número de células de Sertoli presentes nos túbulos seminíferos, que permanece o mesmo durante todas as fases reprodutivas do carneiro. O que ocorre é apenas uma diminuição de tamanho da célula, num processo degenerativo e hipotrófico na fase de menor circunferência escrotal e um aumento de tamanho, que melhora a espermatogênese na fase de maior circunferência escrotal.
- O fotoperíodo tem forte influência sobre as estações reprodutivas em carneiros Suffolk, pois os meses de menor e maior comprimento do dia coincidem exatamente com as alterações histológicas que ocorrem nas fases de menor e maior circunferência escrotal, respectivamente.
- As análises morfométricas tiveram grande eficácia na definição das fases de menor circunferência escrotal e maior circunferência escrotal, tanto no estudo morfológico, quanto no estudo imunohistoquímico do epitélio germinativo.
- Quanto aos anticorpos utilizados nas reações, os anticorpos monoclonais vimentina e Ki-67, mostraram-se eficientes na marcação das células do epitélio germinativo, enquanto que o anticorpo monoclonal Placental Alkaline Phosphatase (PLAP), não é eficiente na marcação do epitélio germinativo em tecidos normais.
- As descrições detalhadas sobre a histologia testicular contidas neste trabalho, contribuem de forma didática à diversas áreas relacionadas a reprodução.

- As informações sobre a histologia testicular de carneiros Suffolk contidas neste estudo permitem dizer que o carneiro terá maior sucesso reprodutivo na fase em que apresenta maior circunferência escrotal quando comparada à fase em que o carneiro apresenta menor circunferência escrotal.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Biology of Reproduction**, v. 3, p. 13- 22, 1998.
- ARISAWA, E. A. L., MORAES, E. PCNA and KI-67 cell-cycle makers: A brief review. **Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, v.2, n.1, p. 54-60, jan./jun., 1999.
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, p. 11- 28, 1960.
- ASCHOFF, J. Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. In: HEKKENS, W.T.J.M.; KERKHOF, G.A.; RIETVELD, W.J. **Trends in Chronobiology**. Oxford: Pergamon Press, 1988. p.149-161.
- BEÇAK, W. e PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1976.
- BECK, S. D. **Insect photoperiodism**. 2 ed. New York: Academic Press, 1980.
- BICUDO, S.D. **Sistemas de acasalamento em ovinos: monta natural e inseminação artificial**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, 2005.
- BIELLI, A.; PEDRANA, G.; GASTEL, M.T.; CASTRILLEJO, A.; MORANÃ, A.; LUNDEHEIM, N.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of grazing management on the seasonal change in testicular morphology in Corriedale rams. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 93-105, 1999.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- BROWN, D. C., GATTER, K. C. Monoclonal antibody KI-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, p. 489-03, 1990.
- BRUNO, S., DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by KI-67 antibody in HL-60 cell. **Cell Proliferation**, v. 25, n. 1, p. 31-40, 1992.
- CARDOSO, F.M.; QUEIROZ, G.F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v. 17, p. 77-88, 1988.
- CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome: FAO, 1991.
- CIPOLLA-NETO, J.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Introdução ao estudo da Cronobiologia**. 1ª. ed. São Paulo: Ícone, 1988.

COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. New York: Academic, 1977.

COUROT, M. Endocrine control of the supporting and germ cells of the impuberal testis. **Journal of Reproduction and Fertility** (Suppl.2), p. 89-101, 1967.

COUROT, M.; ORTAVANT, R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 47-60, 1981.

DELLA COLLETA, H. H. M; CARVALHO, H. F. Células de Leydig. In: CARVALHO, H. F; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005.

DICKSON, K.A.; SANFORD, L.M. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the southeastern Canadian prairies. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 189-203, 2005.

FRANÇA, L. R; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H. F; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005.

GASTEL, T; BIELLI, A; PEREZ, R; LOPEZ, A; CASTRILLEJO, A; TAGLE, R; FRANCO, J; LABORDE, D; FORSBERG, M. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams**. *Animal Reproduction Science* 40, 59 –75; 1995.

GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER H-H, SCHWAB U, STEIN H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, 133:1710-1715; 1984.

GERLACH, T.; AURICH, J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster – a review. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 197-213, 2000.

GÜNDOĞAN, M. Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andrological parameters of two Turkish sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 312-316, 2007.

HAZLERIGG, D.C.; MORGAN, P.J.; MESSENGER, S. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, p. 283 – 301, 2001.

HELLGRENT, E.C., LOCHMILLER, M.S., AMOSS, JR. M.S., SEAGER, S.W.J., MAGYAR, S.J., COSCARELLI, K.P. & GRANT, W.E. **Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurements and semem characteristics in the collared peccary**. *J. Reprod. Fert.*, v.85: p. 677-86, 1989.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T; PERREAU, C. and LINCOLN, G.A. Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. **Journal of reproduction and fertility**. 74, 329-334; 1985.

HULET, C.V.; SHELTON, E.M. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. p. 397-411.

IPARDES. **Perfil municipal de Pinhais**. Disponível em: < http://www.ipardes.gov.br/perfil_municipal/MontaPerfil.php?Municipio=83320 > Acesso em: 04 jan. 2007.

JOHNSON, L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. **Biology and Reproduction**, v.32, p.1181-1190, 1986.

JOHNSON, L; VARNER, D.D; ROBERTS, M.E; SMITH, T.H; KEILLOR, G.E. and SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science** v 60-61, p 471-480; 2000.

JOHNSON, M.H.; EVERITT, B.J. **Essential Reproduction**. 5. ed. Oxford: Blackwell Science, 2000.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARAGIANNIDISA, A; VARSAKELIB, S.; ALEXOPOULOSA, C.; AMARANTIDIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small Ruminant Research**, v. 37, p. 125-130, 2000.

KILGOUR, R.J.; COUROT, M.; PISSELET, C.; DUBOIS, M.P.; SAIRAM, M.R. Inhibition of FSH but not LH affects spermatogenesis in the mature ram. **Animal Reproduction Science**, v. 34, p. 253-264, 1994.

LEVINE AJ, PERRY ME, CHANG A, SILVER A, DITTMER D, WU M. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer** 69: 409-16, 1994.

LINCOLN, G.A.; SHORT, R.V. Seasonal breeding: nature's contraceptive. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 36, p. 1-51, 1980.

LINCOLN, G.A. Seasonal aspects of testicular function. In: BURGER, H.; De KRETSEER, D. (Ed.). **The Testis**. Raven : New York, 1989. p. 329-385.

LINCOLN, G.A; LINCOLN, C.E. and MCNEILLY, A.S. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p 623-633. 1990.

LINCOLN, G.A. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 203-217, 1992.

LINCOLN, G.A. Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size in rams. **Journal of Endocrinology**, v. 144, p. 471-481, 1994.

LINCOLN, G.A.; ANDERSSON, H.; LOUDON, A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. **Journal of Endocrinology**, v. 179, p. 1-13, 2003.

LINCOLN, G.A. Melatonin entrainment of circannual rhythms. **Chronobiology International**, v. 23, p. 301 – 306, 2006.

LINCOLN, G.A.; CLARKE, I.J.; HUT, R.A.; HAZLERIGG, D.G. Characterizing a Mammalian Circannual Pacemaker. **Science**, v. 314, p. 1941-1944, 2006.

LIU, S.C.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**, 36: 145-51, 2000.

MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; O'DONNELL, L.; DE KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M.. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **Journal of Endocrinology**, v. 148, p.1–9, 1996.

MARQUES, M.D., GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação temporal. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo: Edusp. 1997. p.45-84.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 1ª. ed. São Paulo: Edusp, 1997.

MARTIN, G.B.; HÖTZEL, M.J.; BLACHE, D.; WALKDEN-BROWN, S.W.; BLACKBERRY, M.A.; BOUKHLIQ, R.; FISHER, J.S.; MILLER, D.W. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 165-175, 2002.

MICKELSEN, W.D.; PAISLEY, L.G.; DAHMEN, J.J. The effect of season on the scrotal circumference and sperm motility and morphology in rams. **Theriogenology**, v. 16, p. 45-51, 1981.

MICKELSEN, W.D.; PAISLEY, L.G.; DAHMEN, J.J. Seasonal variations in scrotal circumference, sperm quality and sexual ability in rams. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, p. 376-380, 1982.

MIGLINO, M.A.; SONNER, J.B.; SANTOS, T.C.; CARVALHAL, R.; ASSIS NETO, A.C.; MOURA, C.E.B.; OLIVEIRA, M.F. **Aspectos macroscópicos e morfométricos dos testículos de catetos e queixadas**. Biota Neotropica, v.4, 2004. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/>> Acesso em 5 jan. 2006

MILCZEWSKI, V. **Influência Sazonal na flutuação de ovinos da raça Suffolk em latitude baixa:** inter-relações entre circunferência escrotal, parâmetros morfológicos testiculares e testosterona sérica com a produção de sêmen. Curitiba: UFPR, 2008. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MORTIMER, D. and LINCOLN, G.A. Ultrastructural study of regressed and activated testes from Soay rams. **Journal of Reproduction and Fertility** 64, 437-442; 1982.

OLDHAM, C.M.; ADAMS, N.R.; GHERARDI, P.B.; LINDSAY, D.R.; MACKINTOSH, J.B. The influence of level of feed intake on sperm producing capacity of testicular tissue in the ram. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29. p. 173-179, 1978.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 289 – 318, 2001.

ORTAVANT, R. Le cycle spermatogénétique chez le belier. **Annales de Zootechnie** 8, 185-244; 1959.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. Espermatogénese em los mamíferos domésticos. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduccion de Los Animales Domésticos**. Zaragoza: Acribia, p. 170-190. 1984.

PITTENDRIGH, C. S. Circadian rhythms and circadian organization of living systems. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, p.159-184, 1960.

PINEDA, M.H. Reproductive patterns of sheep and goat. In: McDonald LE. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. 4^{ed}, Philadelphia: Lea & Fabiger, 428-447, 1989.

RONDON, A. S; RIBAS, J. A. S; CAMARGO, L. M; GERMINARO, A. PERSONA, L. N; SIMÕES, M. J; FRANCO, P.C. **Aspectos histológicos do testículo do lobinho do mato (Cerdocyon thous)**. Disponível em: <http://www.unic.br/histologia/resumo_testiculo_lobinho.htm> Acesso em 29 de dez. 2005

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. The 'ram effect' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe - Review. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 1-16, 2002.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep – a review. **Small Ruminant Research**, v. 48, p. 155-171, 2003.

SANTIAGO-MORENO, J.; GOMEZ-BRUNET, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; MALPAUX, B.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p. 416-429, 2005.

SASAKI, K; MURAKAMI, T; KAWASAKI, M, TAKAHASHI, M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. **Journal of Cellular Physiology**, v.33, p. 579-84, 1987.

SCHANBACHER, B.D. and FORD, J.J. Photoperiodic regulation of ovine spermatogenesis: relationship to serum hormones. **Biology of Reproduction** v.20, p 719-726. 1979.

SCHLÜTER C, DUCHROW M, WOHLLENBERG C, BECKER MH, KEY G, FLAD H, GERDES J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **The Journal of Cell Biology**, 123:513–522. 1993.

SOARES, F.D. **Avaliação da expressão das proteínas p53, bcl-2 e antígeno de proliferação celular KI-67 em lesões hiperplásicas, cancerizáveis e carcinomas de células escamosas bucais**. Niterói: UFF, 2005. 223f. Dissertação (Mestrado) - Patologia Buco-Dental – Curso de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

TOLOSA, E. M; RODRIGUES, C. J; BEHMER, O. A; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para Histologia normal e patológica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003.

WALLGREN, M; KINDAHL, H. and RODRIGUEZ-MARTINEZ; H. Alterations in testicular function after endotoxin injection in the boar. **International Journal of Andrology** 16, 235-243; 1993.

WROBEL, K-H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annal of Anatomy**, v. 177, p. 19-32, 1995.

WOODFILL, C.J.; WAYNE, N.L.; MOENTER, S.M.; KARSCH, F.J. Photoperiodic synchronization of circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific cues. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 965-976, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Média das análises morfométricas nas fases do ciclo reprodutivo	67
APÊNDICE 2 - Média das análises imunohistoquímicas nas fases do ciclo reprodutivo.....	68
APÊNDICE 3 - Porcentagem do número de túbulos KI-67 + nas fases do ciclo reprodutivo.....	69

APÊNDICE 1

MÉDIA DAS ANÁLISES MORFOMÉTRICAS NAS FASES DO CICLO REPRODUTIVO

Fase de menor circunferência escrotal		Diâmetro total 1	Diâmetro total 2	Diâmetro camada celular	Nº de camadas	Sertoli	Espermatogônia	Espermatócito	Espermátide redonda	Espermátide alongada (inclusive sptz)
01	01	194,1	195,6	60,9	5	2,5	9,3	6,4	11,7	3,3
	02	199,9	200,8	57,8	4,8	2,5	10,2	8,2	8,2	5,1
	03	220,2	230,2	76,6	5,6	2,5	12	9,7	6,6	4,3
706	01	182,2	185,4	42,3	3,3	2,6	5,1	4,9	8,1	3,1
	02	154,3	171,3	47,3	4,8	2,4	6,2	5,1	6,3	3,2
	03	159,7	163,8	43,7	3,2	3,2	5,6	4,9	7,7	2,3
732	01	181,9	181,6	33,6	2,7	3,6	5,1	4,4	5	1,1
	02	170,4	173,5	28,8	2,5	2,4	5,6	4,4	4,2	1,5
	03	148,9	172,9	35,1	3,2	2,9	6,6	6,6	7,7	3,1
763	01	202,4	202,9	53,4	4,7	2,4	7,8	7,3	11,4	9,9
	02	184,2	186,4	62,4	4,2	2,5	7,4	7,6	5,9	6,4
	03	203,3	205,7	53,8	4,8	2,7	7,5	7,4	17,1	5,7
779	01	153,1	153,7	39,9	3,6	2,3	5,5	5,4	6,8	2,3
	02	152,5	164,2	49,9	3,7	2,5	6,2	6,5	6,4	2,4
	03	156,9	156,8	37,1	3,6	2,3	5,7	6	7,5	2,2
781	01	186,1	187,1	48,1	3,8	3,7	6,7	6,6	8,5	3,1
	02	181,9	181,9	43,3	3,4	4,2	6,3	5,2	10,3	3,4
	03	174,1	175,8	42,3	3,4	2,7	6,7	5,3	8,5	3,2
Fase de maior circunferência escrotal		Diâmetro total 1	Diâmetro total 2	Diâmetro camada celular	Nº de camadas	Sertoli	Espermatogônia	Espermatócito	Espermátide redonda	Espermátide alongada (inclusive sptz)
701	01	261,6	265,9	80,8	6,3	2,5	8,8	11,3	13,6	17,1
	02	240,7	251,9	74,1	5,2	2,1	5,9	10	13,2	15,8
	03	256,6	265	74,6	7,1	3,5	10,2	14,4	16,6	16,8
747	01	229,7	238,1	71,2	5,7	3,6	8,7	9,2	14,3	19,6
	02	238,7	240,4	67,1	6	2,8	9,8	9,8	17,2	16,9
	03	226,7	229,2	64,3	5,7	3,1	10,6	9,6	16,9	14,6
754	01	240,6	246,1	65,8	5,5	2,7	11,7	9,8	15,2	18,1
	02	245,1	245,2	60,5	5,4	2,4	13,2	10,1	27,4	22,7
	03	258,9	259,4	67,4	5,8	3	11,9	13,2	24,1	16,5
775	01	224,4	233,7	65,1	6,1	2,7	10,4	9,7	20,5	18
	02	235,2	233,3	70,5	5,5	3,1	12,2	7,9	24,2	17,5
	03	217,4	220,1	61,6	5,8	2,8	10,3	7,8	16,6	19,8
806	01	236,7	242,5	68,7	7,1	2,6	10,5	8,8	23,7	16,1
	02	233,7	235,6	63,4	5,7	2,9	11,1	10	18	16,1
	03	230,3	233,5	59,1	6,1	3,1	10,6	9,1	26,3	23,3
822	01	231,1	236,6	61,6	6,2	2,7	8,1	6,5	16,9	21,1
	02	223,3	224,9	56,8	4,9	2,9	9,4	7,4	20,4	14,9
	03	222,6	222,8	46,8	5	2,9	9,9	8,6	18,1	14,3

APÊNDICE 2

MÉDIA DAS ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS NAS FASES DO CICLO REPRODUTIVO

Fase de menor circunferência escrotal		Ki-67	VIMENTINA
01	01	15,1	3,6
	02	13,3	3,8
	03	10,9	3,2
706	01	11,2	3,5
	02	9,5	3,1
	03	10	3,2
732	01	6,1	3,1
	02	5,7	3,3
	03	10,8	3,3
763	01	21,4	3,7
	02	12,3	2,6
	03	22,8	3
779	01	9,1	2,7
	02	8,8	3,3
	03	9,7	2,6
781	01	11,7	3,6
	02	13,2	3,8
	03	11,8	3,4
Fase de maior circunferência escrotal		Ki-67	VIMENTINA
701	01	30,2	3,5
	02	29,1	2,9
	03	34,8	4,1
747	01	34	3,9
	02	34,3	3,3
	03	31,5	3,6
754	01	33,4	3,1
	02	48,2	2,6
	03	40,6	3,1
775	01	38,6	2,9
	02	41,8	3,3
	03	36,5	3,2
806	01	39,8	3,1
	02	34,5	3,2
	03	49,1	3,2
822	01	35,4	3,2
	02	32,7	3,1
	03	40,6	3,6

APÊNDICE 3

PORCENTAGEM DO NÚMERO DE TÚBULOS Ki-67 + NAS FASES DO CICLO REPRODUTIVO

ANIMAL		TOTAL	+	-	% (+)	
Fase de menor circunferência escrotal	01	01	53	29	24	54,72
		02	47	24	23	51,06
		03	40	19	21	47,50
	706	04	63	45	18	71,43
		05	40	20	20	50,00
		06	43	23	20	53,49
	732	07	64	35	29	54,69
		08	74	28	16	78,38
		09	28	8	20	28,57
	763	01	44	24	20	54,55
		02	37	22	15	59,46
		03	37	22	15	59,46
	779	04	60	29	31	48,33
		05	76	45	31	59,21
		06	63	23	40	36,51
	781	07	61	28	33	45,90
		08	54	27	27	50,00
		09	71	38	33	53,52
TOTAL					53,15 %	
ANIMAL		TOTAL	+	-	% (+)	
Fase de menor circunferência escrotal	701	01	22	10	12	45,45
		02	26	15	11	57,69
		03	18	12	6	66,67
	747	04	30	13	17	43,33
		05	32	15	17	46,88
		06	39	23	16	58,97
	754	07	43	27	16	62,79
		08	36	19	17	52,78
		09	36	26	10	72,22
	775	01	30	16	14	53,33
		02	33	25	8	75,76
		03	37	28	9	75,68
	806	04	40	26	14	65,00
		05	31	19	12	61,29
		06	30	24	6	80,00
	822	07	25	15	10	60,00
		08	29	21	8	72,41
		09	42	30	12	71,43
TOTAL					62,32 %	